



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ
ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Ζ.ΤΣΑΚΡΗΣ



Διδακτορική Διατριβή

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ β -ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΣΤΑ GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΑ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ

ΕΥΓΕΝΙΑ ΓΡΙΒΑΚΟΥ

ιατρός

ΑΘΗΝΑ 2018

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΣΤΑ GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ»

ΕΥΓΕΝΙΑ ΓΡΙΒΑΚΟΥ

ΕΚΠΑ, Ιατρική σχολή, 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Δρ Νικόλαος Σπανάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ (επιβλέπων)
2. Δρ Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
3. Δρ Γεωργία Βρυώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΜΕΛΗ 7ΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Δρ Νικόλαος Σπανάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
2. Δρ Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
3. Δρ Γεωργία Βρυώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
4. Δρ Σπυριδων Πουρνάρας, Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
5. Δρ Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
6. Δρ Ευαγγελία Δημητρούλια, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
7. Δρ Θεόδωρος Πιτταράς, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

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



Ευχαριστίες	10
Περίληψη	12
Abstract	16

I. Γενικό Μέρος

1.Μικροβιακή αντοχή

1.1 Εισαγωγή – Ορισμοί.....	22
1.2 Το μέγεθος της απειλής.....	23
1.3 Αιτίες της αυξανόμενης μικροβιακής αντοχής	
1.3.1.υπερκατανάλωση και ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών στους ανθρώπους.....	30
1.3.2 Χρήση αντιβιοτικών στη ζωοτροφία και τη γεωργία.....	36
1.3.3 Ρύπανση από αντιβιοτικά , φαρμακευτικές εταιρείες και εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων.....	39
1.4 Έλλειψη νέων αντιμικροβιακών – στασιμότητα στην έρευνα και ανάπτυξη.....	41
1.5 Διεθνής κινητοποίηση για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής. Εθνικά και Διεθνή Σχέδια Δράσης, Εθνικό σχέδιο δράσης «Προκρούστης».....	46

2. Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής

Εισαγωγή.....	51
2.1 συγγενής και επίκτητη μικροβιακή αντοχή.....	52
2.2 Αντοχή σε επίπεδο κοινότητας και σε κυτταρικό επίπεδο	
2.2.1 Αντοχή σε κυτταρικό επίπεδο.....	54
2.2.2 Αντοχή σε επίπεδο κοινότητας (Community Level Resistance).....	61
2.2.3 Συνεργητική δράση κυτταρικής και συλλογικής αντοχής.....	65
2.3 γενετική βάση της αντοχής	
2.3.1 μεταλλάξεις γονιδίων.....	67
2.3.2 απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού.....	67
2.3.3. Μεταθετά γενετικά στοιχεία.....	68
2.3.4. Γονιδίωμα αντοχής (Resistome).....	72

3. Επιδημιολογία αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Εισαγωγή.....	73
3.1 νοσοκομειακές λοιμώξεις από gram-αρνητικά.....	74
3.2 λοιμώξεις κοινότητας από gram-αρνητικά.....	81

3.3 δεδομένα αντοχής των gram-αρνητικών στην Ελλάδα και την Ευρώπη.....	83
4. Μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων	
4.1 κυτταρικό τοίχωμα gram-αρνητικών.....	103
4.2 β- λακταμάσες.....	104
5. Ταξινόμηση β-λακταμασών	
Εισαγωγή.....	105
5.1. Μοριακή ταξινόμηση κατά «Ambler».....	106
5.2. λειτουργική ταξινόμηση κατά «Bush, Jacoby και Medeiros».....	108
6. Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs)	
Εισαγωγή.....	113
6.1. SHV-ESBLs.....	117
6.2. TEM-ESBLs.....	118
6.3. CTX-M-ESBLs.....	119
6.4 OXA-ESBLs.....	123
6.5 άλλες εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες.....	125
7. Εργαστηριακή διάγνωση των ESBLs	
7.1 συμβατική εργαστηριακή διάγνωση.....	126
7.2 προβλήματα στη φαινοτυπική ανίχνευση της παραγωγής ESBLs.....	134
7.3 τεχνικές ταχείας ανίχνευσης της παραγωγής ESBLs.....	135
7.4 μοριακές τεχνικές ανίχνευσης ESBLs.....	138
8. Παρουσία των ESBLs σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη	
8.1 Εισαγωγή.....	145
8.2 Καρβαπενεμάσες.....	146
8.2.1 KPC καρβαπενεμάσες.....	146
8.2.2 Μεταλλο-β-λακταμάσες.....	148
8.2.3 OXA-καρβαπενεμάσες.....	152
8.3 Ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και καρβαπενεμασών ή/και AmpCs.....	153
KPC-καρβαπενεμάσες και ESBLs.....	154
Μεταλλο-β-λακταμάσες και ESBLs.....	155
OXA-καρβαπενεμάσες και ESBLs.....	156

<i>AmpC-β-λακταμάσες και ESBLs</i>	157
<i>ESBLs και πολλαπλές β-λακταμάσες</i>	157
8.4 Οι «κρυμμένες» <i>ESBLs</i> στα φαινοτυπικά τεστ.....	158

II. Ειδικό Μέρος

Εισαγωγή – σκοπός μελέτης	162
--	-----

1.Υλικό και μέθοδοι

1.1 Βακτηριακά στελέχη.....	170
-----------------------------	-----

1.2 Καλλιέργεια και απομόνωση.....	172
------------------------------------	-----

1.3 Ταυτοποίηση στελεχών της συλλογής.....	172
--	-----

1.4 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά – προσδιορισμός της MIC.....	173
--	-----

1.5 Γονοτυπικός έλεγχος – Μοριακή τυποποίηση των στελεχών

1.5.1 εξαγωγή του βακτηριακού DNA.....	175
--	-----

1.5.2 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	176
--	-----

1.5.3 ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε γέλη αγαρόζης.....	182
---	-----

1.5.4 καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχιση	184
--	-----

1.6 Φαινοτυπικές δοκιμασίες.....	186
----------------------------------	-----

1.6.1 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή <i>ESBLs</i>	186
--	-----

1.6.2 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή και διαφοροποίηση <i>MBL, KPC</i>	187
---	-----

1.6.3 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή <i>AmpC-β- λακταμασών</i>	188
---	-----

1.6.4 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή <i>ESBLs</i> με το τροποποιημένο τεστ....	188
---	-----

1.7 Προσδιορισμός θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας , ευαισθησίας και ειδικότητας.....	190
---	-----

2.Αποτελέσματα

A.Εντεροβακτηριακά	192
---------------------------------	-----

A.1. κατανομή των γονιδίων <i>ESBLs</i> στα εξεταζόμενα κλινικά στελέχη.....	194
--	-----

A.2 κατανομή των γονιδίων <i>ESBLs</i> ανάμεσα στα είδη των <i>gram-αρνητικών</i>	195
---	-----

A.3 κατανομή των γονιδίων των άλλων τύπων β-λακταμασών.....	196
---	-----

A.4 κατανομή των γονιδίων <i>KPC, MBL</i> και <i>AmpC</i> στα είδη	198
--	-----

A.5 επίπεδα ευαισθησίας των εξεταζομένων στελεχών.....	201
--	-----

A.6 αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης

A.6.1. <i>CLSI ESBL confirmatory test</i>	202
---	-----

A.6.2. τροποποιημένο CLSI ESB Lconfirmatory test με προσθήκη PBA και EDTA.....	202
A.6.3. αυξήσεις στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής.....	208
B. P.aeruginosa	216
B.1. κατανομή των γονιδίων ESBLs.....	220
B.2 κατανομή των γονιδίων των άλλων τύπων β-λακταμασών.....	220
B.3 αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης	
B.3.1. CLSI ESBL confirmatory test	221
B.3.2. τροποποιημένο CLSI ESBL confirmatory test με προσθήκη PBA και EDTA.....	222
B.3.3. αυξήσεις στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής	224
3. Συζήτηση	228
4. Συμπέρασμα	238
5. Βασικά σημεία της διατριβής	240
III. Βιβλιογραφία	246
IV. Δημοσιεύσεις από την παρούσα διατριβή	288

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στους καθηγητές μου: στον επιβλέποντα κ.Νικόλαο Σπανάκη, αναπληρωτή καθηγητή μικροβιολογίας ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ , την κ.Γεωργία Βρυώνη , αναπληρώτρια καθηγήτρια μικροβιολογίας ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ, και τον κ.Αθανάσιο Τσακρή , καθηγητή μικροβιολογίας ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ. Τους ευχαριστώ για την ανάθεση της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τη γεμάτη καλοσύνη και υπομονή καθοδήγηση τους . Ιδιαίτερα,θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Α.Τσακρή , χωρίς τον οποίο η παρούσα διατριβή θα είχε παραμείνει μακρινό όνειρο. Η καθοδήγησή του , το αμέριστο ενδιαφέρον , η δημιουργική κριτική του και η εμπιστοσύνη που μου επέδειξε ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Ευχαριστώ και ευγνωμονώ την κ.Αγγελική Πούλου,διευθύντρια Μικροβιολογικού Ν.Γ.Ν Σερρών, για την ανεκτίμητη επιστημονική καθοδήγηση που γενναιόδωρα μου παρείχε.Την ευχαριστώ για το χρόνο που διέθεσε, καθώς για όσα από τη βαθιά γνώση και εμπειρία της μου μετάγγισε . Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα το προσωπικό του εργαστηρίου της Μικροβιολογίας για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους . Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τις κυρίες Ηλέκτρα Λευτάκη και Άρτεμι Πλατανιώτη από το διοικητικό προσωπικό του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ευχαριστώ τον καθηγητή Σπ.Πουρνάρα, τον αναπληρωτή καθηγητή Ι.Παπαπαρασκευά ,την επίκουρη καθηγήτρια Ε.Δημητρούλια και τον επίκουρο καθηγητή Θ.Πιτταρά για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος , ευχαριστώ όλους εκείνους , συγγενείς ,φίλους και συναδέλφους , που με στήριξαν με την υπομονή τους και την αγάπη τους κατα τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, ιδιαίτερα τους μικροβιολόγους Δήμητρα Υφαντή και Γιάννη Δενδρινό,καθώς και τη βιολόγο Πηνελόπη Σαμαρά.

Περίληψη

Η αντοχή των gram-αρνητικών βακτηρίων στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς αποτελεί μείζον θέμα δημόσιας υγείας παγκόσμια, οφειλόμενο ως επί το πλείστον στην παραγωγή εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBLs). Το φαινόμενο αυτό πρωτοεμφανίστηκε τη δεκαετία του 1980 και σήμερα έχει διαστάσεις ενδημίας σε αρκετές περιοχές του κόσμου. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος εισήχθησαν ευρέως στη θεραπευτική οι καρβαπενέμες, με συνέπεια να αναδυθούν στελέχη που παράγουν ταυτόχρονα ESBLs και καρβαπενεμάσες. Επίσης, υπάρχουν στελέχη που παράγουν ταυτόχρονα ESBLs και AmpC-β-λακταμάσες. Παρουσία αυτών των ενζύμων, η παραγωγή των ESBLs δεν αποκαλύπτεται με τις τρέχουσες φαινοτυπικές μεθόδους. Οι ESBLs παραμένουν «κρυμμένες» και η συχνότητά τους υποεκτιμάται.

Το CLSI προτείνει για τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs μια δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων, το CLSI ESBL Confirmatory Test. Στο τεστ αυτό χρησιμοποιούνται 2 κεφαλοσπορίνες (κεφταζιμίμη και κεφταζιδιμίμη). Το CLSI ESBL Test δεν εφαρμόζεται σε στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες ή AmpCs.

Με την παρούσα διατριβή, προσπαθήσαμε να τροποποιήσουμε το κλασικό τεστ ώστε να βελτιωθεί η απόδοσή του, ιδιαίτερα σε μια εποχή με αυξανόμενη συχνότητα συμπαραγωγής ESBLs και καρβαπενεμασών ή AmpCs, φαινόμενο ιδιαίτερα διαδεδομένο στα εντεροβακτηριακά. Στη συνέχεια, θελήσαμε να δοκιμάσουμε αν οι τροποποιήσεις αυτές μπορούν να ανιχνεύσουν αποτελεσματικά τις ESBLs και εκτός των εντεροβακτηριακών, οπότε επιπλέον μελετήσαμε στελέχη *P.aeruginosa* που ταυτόχρονα παράγουν MBLs. Η φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs στην *P.aeruginosa* αποτελεί πρόκληση για τον κλινικό μικροβιολόγο, καθώς η υπερπαραγωγή της ενδογενούς AmpC ή/και η ταυτόχρονη παραγωγή καρβαπενεμασών μπορεί να καλύψει την παραγωγή των ESBLs.

Η τροποποίηση που προτείνουμε συνίσταται στην προσθήκη 400μg βορονικού και 292μg EDTA στους δίσκους της κεφταζιδιμίμης και κεφταζιμίμης χωρίς και με παρουσία κλαβουλανικού. Το βορονικό οξύ είναι αναστρέψιμος αναστολέας των KPC- καρβαπενεμασών και των AmpCs. Το EDTA είναι αναστολέας των MBL.

Θεωρήσαμε , επομένως, ότι με την προσθήκη αυτών των αναστολέων στους δίσκους των αντιβιοτικών θα αποκαλυπτόταν με τη συνέργεια του κλαβουλανικού ή παραγωγή των ESBLs.

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 368 στελέχη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, που απομονώθηκαν από λοιμώξεις ισάριθμων ασθενών που νοσηλεύτηκαν σε επτά ελληνικά νοσοκομεία κατά το διάστημα 2007-2014. Ο αρχικός έλεγχος των στελεχών συμπεριέλαβε τον καθορισμό των MICs των κυριότερων αντιβιοτικών με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων σε άγαρ, φαινοτυπικές δοκιμασίες για την παραγωγή καρβαπενεμασών και κεφαλοσπορινασών και μοριακές μεθόδους τυποποίησης (single- end και real -time PCRs). Οι PCRs και η αλληλούχιση των τελικών προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των γονιδίων που έφεραν ESBLs, KPCs, MBLs, AmpCs και OXA-48. Συγκεκριμένα, συμπεριλήφθησαν 189 θετικά για την παραγωγή ESBLs στελέχη και 179 στελέχη που δεν παρήγαγαν ESBLs. Από τα 189 θετικά για την παραγωγή ESBLs στελέχη, τα 118 ήταν στελέχη που ταυτόχρονα παρήγαγαν καρβαπενεμάσες ή AmpCs. Από αυτά τα στελέχη, τα 301 ήταν εντεροβακτηριακά και τα υπόλοιπα 67 ήταν στελέχη *P.aeruginosa*. Σε όλα τα στελέχη εφαρμόστηκαν το CLSI ESBL Confirmatory Test και η τροποποιημένη με την προσθήκη βορονικού και EDTA μέθοδος (modified CLSI ESBL test).

Από τη συγκριτική αξιολόγηση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) ανίχνευσε την παραγωγή ESBLs σε 158 από τα 162 στελέχη εντεροβακτηριακών (ευαισθησία 97,5%) και δεν έδωσε κανένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (ειδικότητα 100%). Αντιθέτως, η ευαισθησία του CLSI ESBL Confirmatory Test ήταν 65,4% , ενώ η ειδικότητά του ήταν 97.1% , καθώς έδωσε 4 ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) ανίχνευσε την παραγωγή ESBLs σχεδόν σε όλα τα στελέχη που ταυτόχρονα παρήγαγαν καρβαπενεμάσες ή AmpCs (106 από τα 108, ευαισθησία 98,1%) ,ενώ το CLSI ESBL Confirmatory Test δεν αποκάλυψε την παραγωγή ESBLs σε 55 από τα 108 στελέχη (ευαισθησία 49,1%) . Όσον αφορά στην ανίχνευση των ESBLs σε *P.aeruginosa*, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) έχει ευαισθησία 100% και ειδικότητα 100%, σε αντίθεση με το CLSI ESBL Confirmatory Test , που εντόπισε την παραγωγή ESBLs σε 4 από τα 10 στελέχη που

ταυτόχρονα παράγουν MBL και σε 15 από τα 17 στελέχη που είναι αποκλειστικά ESBL-producers. Η ευαισθησία του CLSI Test είναι 70,3% και η ειδικότητα είναι 92,5%.

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) εκτιμήθηκε ως εύκολης εφαρμογής και χαμηλού κόστους μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα , που μπορεί να διακρίνει με ακρίβεια την παραγωγή ESBLs , χωρίς την προϋπόθεση της γνώσης της ταυτόχρονης παρουσίας καρβαπενεμασών ή AmpCs, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί και σε στελέχη *P.aeruginosa*. Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για επιδημιολογικούς σκοπούς και για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, ενώ μπορεί να συμβάλλει στην αποκλιμάκωση της θεραπείας.

Abstract

Resistance of the Gram negative bacteria to the third generation cephalosporins is a major public health issue worldwide, mostly due to the production of the Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs). This phenomenon was first detected in the 1980s but nowadays has gained endemic dimensions in several regions of the world. Extended-spectrum β -lactamases are mostly plasmid-mediated β -lactamases that efficiently hydrolyze oxyiminocephalosporins and monobactams, yet are inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanate acid. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommends a confirmatory combined-disk (CLSI ESBL Confirmatory Test, 2000) to confirm the production of the extended spectrum beta-lactamases in *E.coli*, *Klebsiella spp*, *P.mirabilis*. It consists of measuring the growth inhibitory zones around cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ) disks with or without clavulanate (CA).

ESBLs, however, may also coexist with other β -lactamases types such as carbapenemases and AmpC- β -lactamases, which may also interfere with the interpretation of ESBL-detection methods since they also hydrolyze the β -lactams, resulting to the underestimation of the prevalence of ESBLs. There is a need, therefore, for an alternative method that can accurately detect ESBLs regardless of a possible coexistence of other types of β -lactamases.

In an attempt to overcome the difficulties and unmask ESBL-production in presence of carbapenemases and AmpCs, we propose a modification of the CLSI ESBL Confirmatory Test. We have found that the CLSI ESBL Test could not identify the production of ESBLs in the majority of examined ESBL-producing isolates that also co-produce carbapenemases or AmpC-beta-lactamases. We further modified the CLSI ESBL Confirmatory Test by simultaneous addition of both 400mg boronic acid and 292mg EDTA on the antibiotic disks containing ceftazidime and cefotaxime with and without clavulanate acid, as these agents inhibit the enzymatic activity of carbapenemases and AmpCs. We hypothesized, therefore, that the addition of these inhibitors will reveal the covert production of ESBLs.

A total of 368 non repetitive (one per patient) clinical isolates of Gram-negative bacteria were included in the study. They were recovered during 2007 to 2014 from seven Greek hospitals. The selected isolates were tested by determination of agar dilution MICs, phenotypic detection of carbapenemases and cephalosporinases and molecular typing methods (single- end και real -time PCRs). The PCR and sequencing analyses were employed for the identification of the ESBLs, KPCs, MBLs, AmpCs and OXA-48 genes. Specifically, 189 genotypically confirmed ESBL-positive isolates and 179 genotypically confirmed ESBL-negative isolates were included. Among the 189 ESBL-positive isolates, 118 were also simultaneous producers of carbapenemases or AmpCs. The collection consisted of 301 isolates of *Enterobacteriaceae* and 67 isolates of *P.aeruginosa*. The CLSI ESBL Confirmatory Test is performed in *Enterobacteriaceae* when no carbapenemases or AmpCs are coproduced. Phenotypic detection of ESBLs in *P.aeruginosa* remains challenging as there is no standardized phenotypic method.

The aim of this thesis is to evaluate the proposed modified method not only in *Enterobacteriaceae* but also in *P.aeruginosa*. We employed the standard CLSI ESBL Confirmatory Test and the modified test at the 368 isolates of the study. The analysis of the results showed that the modified test was able to detect the production of ESBLs in the vast majority of ESBL-producers regardless of the underlying β -lactam resistance mechanism.

Among *Enterobacteriaceae* ,the modified test was found able to detect almost all genotypically ESBL-positive isolates and did not give false-positive results for any of the ESBL-negative isolates. In contrast to the standard CLSI ESBL test , the modified test detected ESBLs among all KPC,NDM and AmpC producers as well the vast majority of VIM and KPC/VIM producers .The sensitivity of the modified test is 97,5% and the specificity is 100% . On the other hand, the sensitivity of the standard CLSI ESBL Confirmatory Test was 65,4% and the specificity was 97.1 % (It gave 4 gave false positive results).

Among *P.aeruginosa* ,the modified test was found able to detect all genotypically ESBL-positive isolates and did not give false-positive results for any of the ESBL-negative isolates (sensitivity 100%,specificity 100%) . In contrast , the standard CLSI

test detected 4 of the 10 VIM/ESBL producers and gave 3 false positive results. The the sensitivity of the standard CLSI ESBL Confirmatory Test is 70,3% and the specificity is 92,5 %.

In conclusion, this thesis evaluated the modified test as a simple, in terms of easy application, and inexpensive method with high sensitivity and specificity, which can accurately detect the production of ESBLs regardless of a possible coexistence of other types of beta- lactamases. The modified method might guide therapeutic options. It can also contribute to collection of the epidemiological data and the adequate application of infection control measures, particularly in countries of complex epidemiology regarding the dispersion of beta-lactamases

Ι. Γενικό Μέρος

1.Μικροβιακή αντοχή

1.1 Εισαγωγή - Ορισμοί

Η αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά φάρμακα αποτελεί αναγνωρισμένο σημαντικό πρόβλημα της Δημόσιας Υγείας . Το πρόβλημα αυτό παρουσιάζει διαχρονικά αυξητική τάση και αφορά κάθε γεωγραφική περιοχή, ανθρώπους και των 2 φύλων και κάθε ηλικιακής ομάδας , δεν περιορίζεται στο περιβάλλον των μονάδων παροχής υπηρεσιών υγείας , όπως είχε αρχικά παρατηρηθεί , αλλά αφορά και τις λοιμώξεις κοινότητας με ολόένα και μεγαλύτερο ρυθμό [1,2,3].

Ορίζουμε ως Μικροβιακή Αντοχή (Antimicrobial Resistance , AMR) το φαινόμενο κατά το οποίο παθογόνοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν μετά τη χρήση φαρμάκων, υπό τη επίδραση των οποίων μέχρι πρότινος θανατώνονταν ή σταματούσε ο πολλαπλασιασμός τους [4,5,6].

Αναλόγως του βαθμού της αντοχής τους στα αντιμικροβιακά φάρμακα , τα μικρόβια διακρίνονται σε:

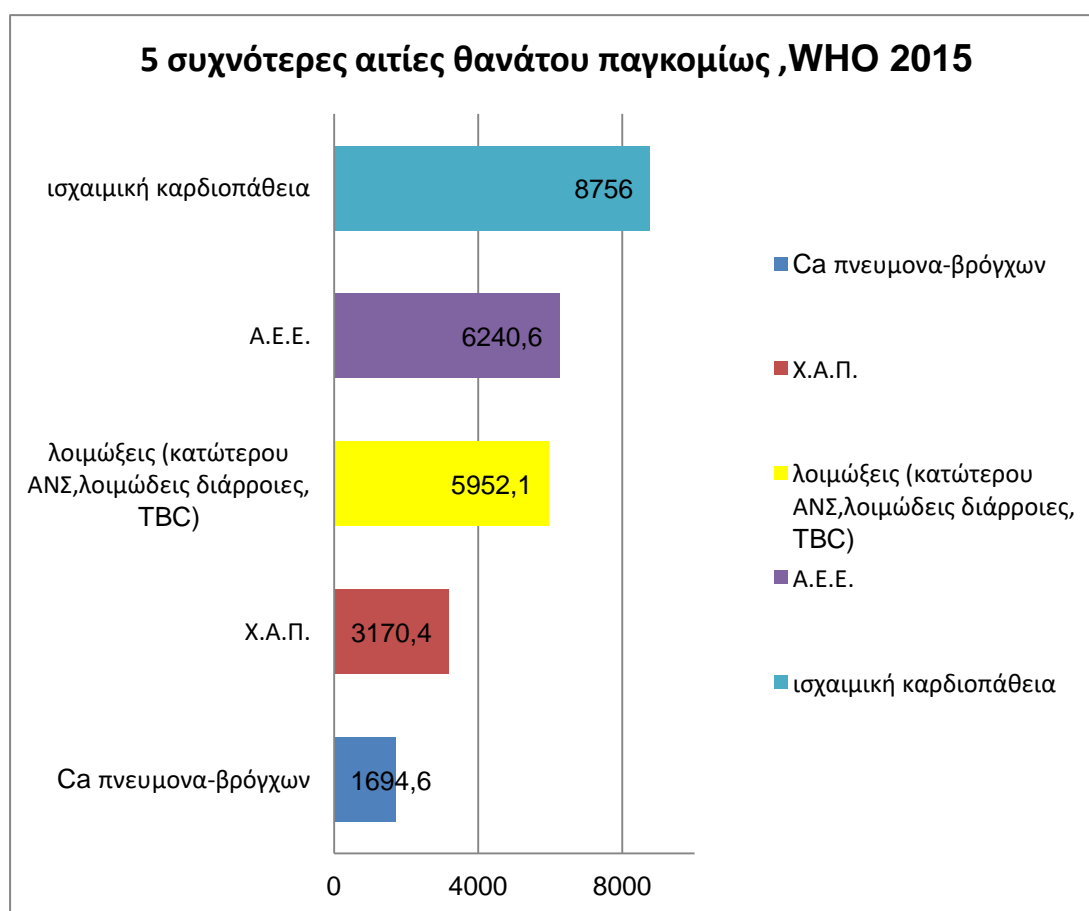
- πολυανθεκτικά (Multidrug Drug Resistant, MDR), όταν είναι ανθεκτικά σε τουλάχιστον έναν παράγοντα σε 3 ή περισσότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών
- εξαιρετικά πολυανθεκτικά (Extremely Drug Resistant, XDR), όταν εμφανίζουν αντοχή σε τουλάχιστον έναν παράγοντα σε όλες τις κατηγορίες των αντιβιοτικών εκτός από μία ή δύο .
- πανανθεκτικά (Pandrug Resistant, PDR) όταν είναι ανθεκτικά σε όλα τα κυκλοφορούντα αντιμικροβιακά .

Η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων φθίνει τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της εμφάνισης των πολυανθεκτικών μικροβίων [2,5,7]. Ο ορατός πλέον κίνδυνος να μεταπέσουμε σε μετά-αντιβιοτική εποχή (post antibiotic era) έχει κινητοποιήσει την επιστημονική κοινότητα, διεθνείς οργανισμούς και εθνικές κυβερνήσεις. Το 2014 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έκρουσε τον κώδωνα του κινδύνου και σε έκθεσή του αναφέρει ότι *«Αυτή η σοβαρή απειλή δεν είναι πλέον μια πρόβλεψη για το μέλλον, αυτό που συμβαίνει αυτή τη στιγμή σε*

κάθε περιοχή του κόσμου έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει οποιονδήποτε, ανεξαρτήτως ηλικίας, σε οποιαδήποτε χώρα. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, όταν τα βακτήρια αλλάζουν έτσι ώστε τα αντιβιοτικά να μην δρουν αποτελεσματικά πλέον σε ανθρώπους που τα χρειάζονται για τη θεραπεία λοιμώξεων, είναι τώρα μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία» [8]

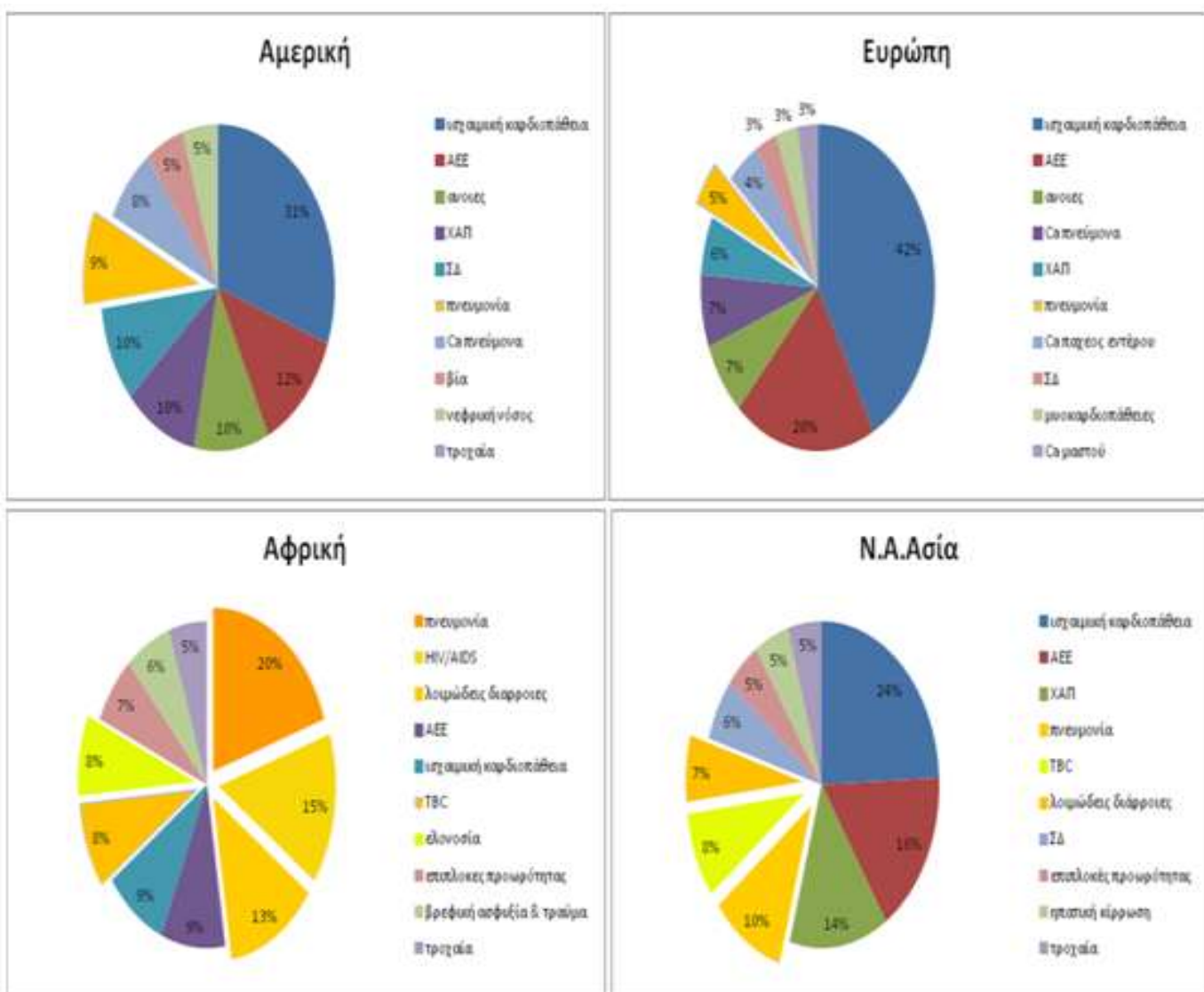
1.2 Το μέγεθος της απειλής

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε την έκταση της απειλής, θα πρέπει αρχικά να εντοπίσουμε το βαθμό επίδρασης των λοιμώξεων στη ζωή των ανθρώπων, όπως αυτό εκφράζεται πχ στο μέσο όρο ζωής, στη νοσηρότητα και θνητότητα. Στην εποχή μας, οι λοιμώξεις εξακολουθούν να βρίσκονται στην πρώτη τριάδα αιτιών νοσηρότητας και θνητότητας, παρά τα πολύ σημαντικά επιτεύγματα της ιατρικής επιστήμης, όπως είναι η ανακάλυψη και χρήση των αντιβιοτικών, οι τεχνικές αντισηψίας και απολύμανσης, οι διαγνωστικές τεχνικές κοκ (εικόνα 1) [9].



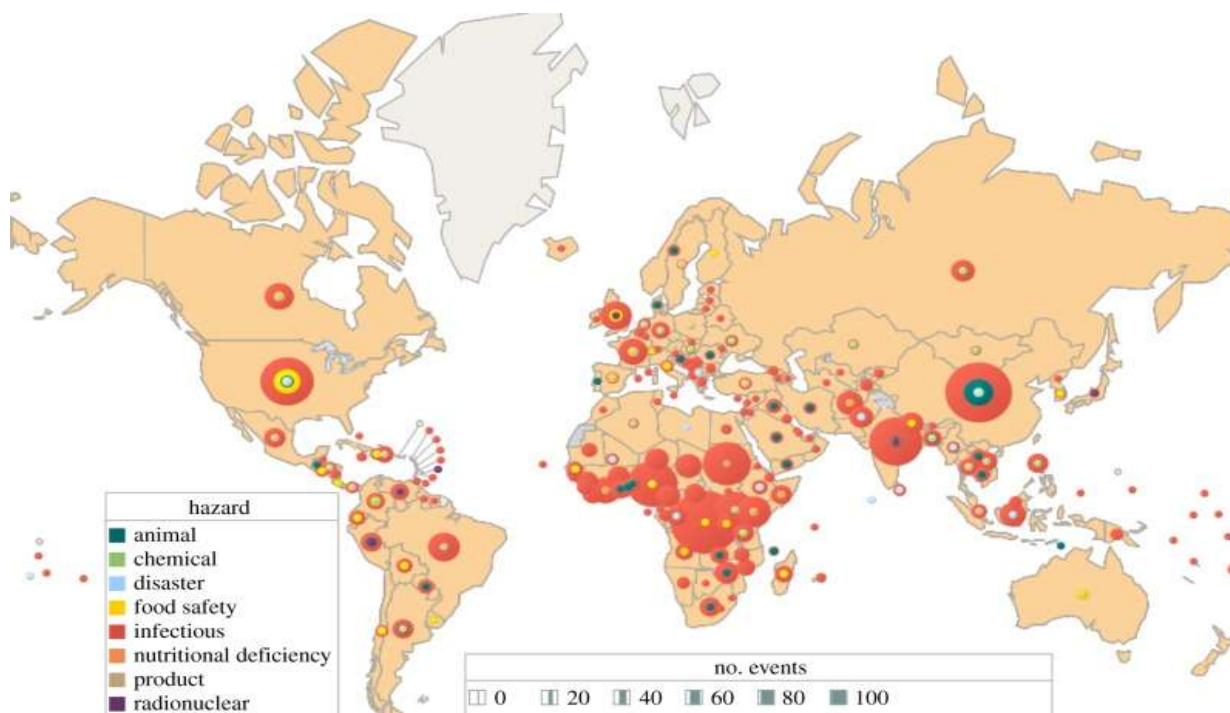
Εικόνα 1 : οι καταγεγραμμένοι για το 2015 θάνατοι από τις 5 συχνότερες αιτίες παγκοσμίως, στοιχεία επεξεργασμένα από τα δεδομένα του Π.Ο.Υ.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας , για το 2015 οι λοιμώξεις και ειδικότερα οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού, οι λοιμώξεις διάρροιας και η φυματίωση αποτελούν την 3^η αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (ισχαιμική καρδιοπάθεια και αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια), αντιπροσωπεύοντας περίπου 5,9 εκατομμύρια θανάτους [9]. Ειδικότερα, η θνητότητα από λοιμώδη νοσήματα κατακτά την 1^η θέση στις χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος (Low and Middle Income Countries, LMICs) , ενώ στις χώρες του Δυτικού κόσμου τα λοιμώδη νοσήματα συνιστούν την 5^η ή 6^η αιτία θανάτου (εικόνα 2) [9] .



Εικόνα 2: κατανομή των συχνότερων αιτιών θανάτου το 2015 ανά γεωγραφικές περιοχές. Οι λοιμώξεις (αποχρώσεις του κίτρινου) αποτελούν κυρίαρχη αιτία θανάτου στις χώρες χαμηλού βιοτικού επιπέδου. Επεξεργασμένα δεδομένα από WHO.

Στο χάρτη που ακολουθεί αποτυπώνονται οι απειλές για τη Δημόσια Υγεία όπως κατεγράφησαν κατά το διάστημα 2001 – 2013 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Όπως φαίνεται , οι εξάρσεις κρουσμάτων λοιμώξεων (outbreaks) αποτέλεσαν την πλειοψηφία των συμβάντων (85%) και παρατηρήθηκαν σχεδόν σε κάθε κατοικημένη ήπειρο [10].

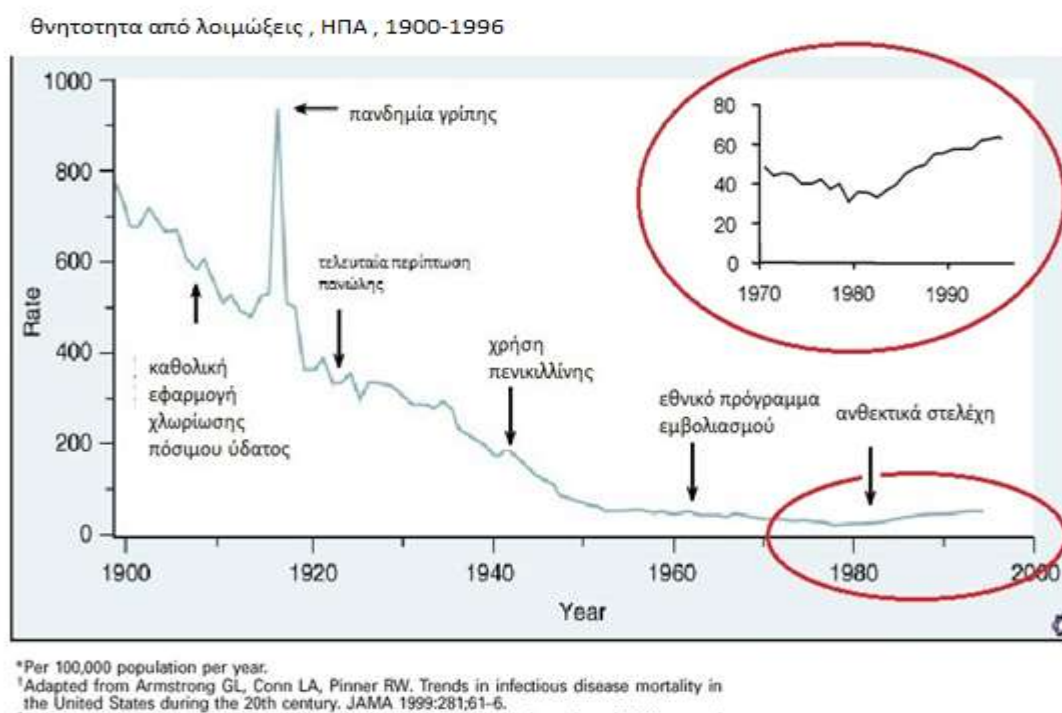


Εικόνα 3: Καταγραφή 2797 απειλητικών καταστάσεων για τη Δημόσια Υγεία ανά είδος και ανά χώρα από τον Ιανουάριο 2001 ως το Σεπτέμβριο 2013. Οι εξάρσεις κρουσμάτων λοιμώξεων αφορούσαν το 85% αυτών. Unpublished WHO data (2013)[10]

Στις Η.Π.Α. η θνητότητα από λοιμώξεις τον 20^ο αιώνα ακολούθησε σημαντική πτωτική πορεία οφειλόμενη κατά κύριο λόγο στη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων , στην εφαρμογή εθνικού προγράμματος εμβολιασμού και στη βελτίωση των υγειονομικών συνθηκών. Η μείωση αυτή συνέβαλε στην απότομη πτώση της βρεφικής και παιδικής θνητότητας καθώς και στην επέκταση του προσδόκιμου ζωής κατά 29,2 έτη [11] .Το 1920 ο μέσος όρος ζωής ήταν τα 56,4 έτη και στις μέρες μας προσεγγίζει τα 80 έτη [12,13] . Στο κλείσιμο όμως του αιώνα ,από το 1985 και έπειτα, άρχισε να παρατηρείται αυξητική τάση των θανάτων από λοιμώξεις , κύρια αίτια της οποίας ήταν η λοίμωξη HIV και η επίταση του φαινομένου της

μικροβιακής αντοχής (εικόνα 3) [14]. Ωστόσο, ενώ όσον αφορά στη λοίμωξη από HIV η θνησιμότητα άρχισε να ελαττώνεται από τα μέσα της δεκαετίας 1990 [15], οι θάνατοι από ανθεκτικές λοιμώξεις παρουσίασαν αύξηση [16,17].

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η χρήση των αντιβιοτικών αποτέλεσε τον κύριο παράγοντα στο να μεταπέσουν οι λοιμώξεις από την 1^η θέση θνητότητας στις αρχές του 1900, υπεύθυνες για το 30% των θανάτων, στην 6^η θέση στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, με ποσοστό περίπου 7% [11,14], συμβάλλοντας επομένως στην επέκταση του προσδόκιμου ζωής, μπορούμε να καταλάβουμε γιατί συνιστά μεγάλη απειλή η απώλεια της αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών εξαιτίας της εμφάνισης των ανθεκτικών μικροβίων.

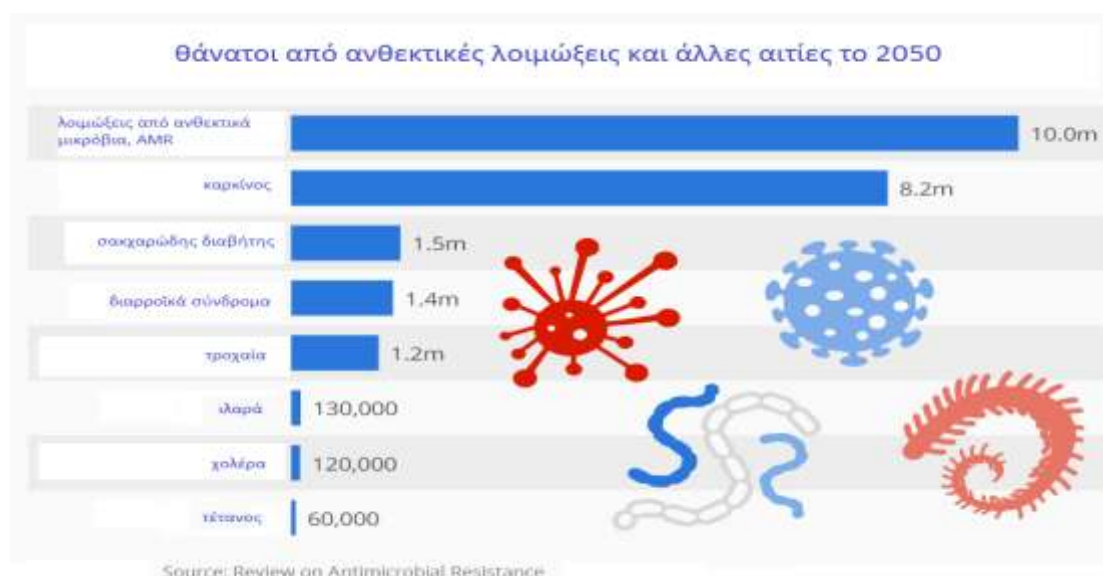


Εικόνα 4: αριθμός θανάτων από λοιμώξεις στις ΗΠΑ, 1900-1996. Την τελευταία περίπου 15ετία του 20^{ου} αιώνα παρατηρείται τάση αύξησης, εν μέρει οφειλόμενη στην εμφάνιση ανθεκτικών λοιμώξεων. Τροποποιημένη εικόνα από CDC και Armstrong et al, JAMA 1999;281;61-6.

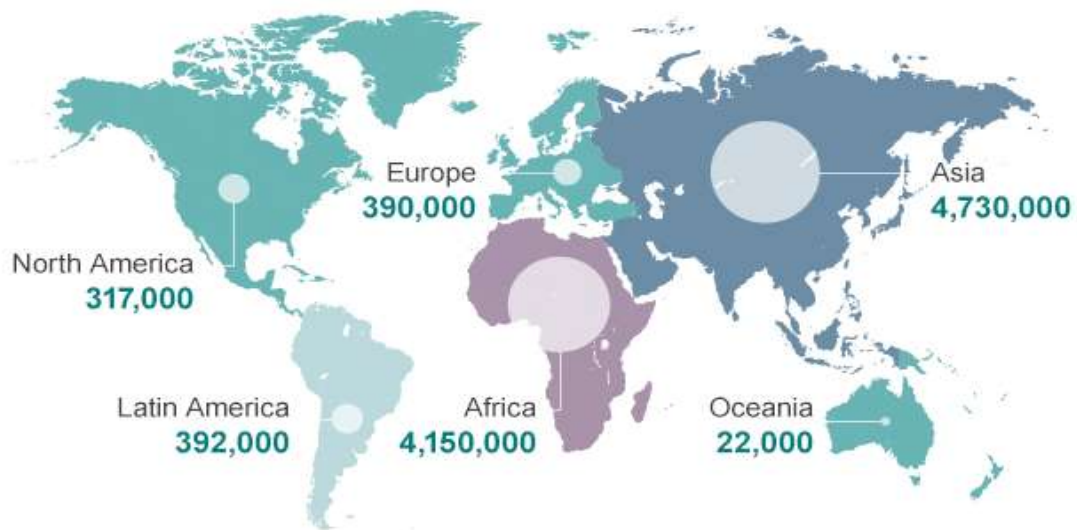
Επί του παρόντος, υπολογίζεται ότι στο φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής οφείλονται 700.000 θάνατοι ετησίως στον κόσμο. Συγκεκριμένα, στην Ευρώπη καταγράφονται 25.000 θάνατοι από ανθεκτικές λοιμώξεις και αύξηση της νοσηλείας κατά 2.5 εκατ. ημέρες ετησίως, ενώ το ετήσιο κόστος σε δαπάνες περίθαλψης και

σε απώλειες παραγωγικότητας ανέρχεται σε 1,5 δισ. ευρώ [18] . Αντίστοιχα , στις ΗΠΑ τουλάχιστον 2 εκατ. άνθρωποι κατ' έτος πάσχουν από λοιμώξεις οφειλόμενες σε ανθεκτικά μικρόβια και 23.000 πεθαίνουν εξαιτίας αυτών. Το ετήσιο κόστος στις ΗΠΑ υπολογίζεται στα 20 δισεκατομμύρια δολάρια [19]. Η θεραπεία μίας ανθεκτικής λοίμωξης είναι περισσότερο δαπανηρή αυξάνοντας το κόστος κατά 6.000-30.000 δολάρια σε σχέση με μία λοίμωξη από ευαίσθητο μικρόβιο. Λόγω της παράτασης της νοσηλείας κατά 6.4-12.7 ημέρες, η συνολική απώλεια εισοδήματος στα νοικοκυριά ανέρχεται σε περισσότερα από 35\$δισ./έτος. Παράλληλα ο κίνδυνος θανάτου είναι δύο φορές μεγαλύτερος σε ασθενείς με ανθεκτικές λοιμώξεις από ότι σε ασθενείς χωρίς ανθεκτικές λοιμώξεις [20-25]. Η Ελλάδα ανήκει στις χώρες που έχουν πληγεί περισσότερο από τα πολυανθεκτικά μικρόβια. Υπολογίζεται ότι τα πολυανθεκτικά μικρόβια προκαλούν περίπου 5000 σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις και περισσότερους από 1000 θανάτους ετησίως στη χώρα μας [26].

Συμφώνα με έκθεση της Ανασκόπησης της Μικροβιακής Αντοχής (Review on Antimicrobial Resistance) το Μάιο του 2016 , που εκπονήθηκε με πρωτοβουλία της βρετανικής κυβέρνησης, προβλέπεται ότι το έτος 2050 ,αν δεν ληφθούν μέτρα, θα συμβαίνουν 10.000.000 θάνατοι ετησίως λόγω ανθεκτικών λοιμώξεων, ενώ το οικονομικό κόστος θα υπερβαίνει τα 100 τρισεκατομμύρια δολάρια και θα μειωθεί το ακαθάριστο εθνικό προϊόν (GDP) κατά 2%-3,5%. Δηλαδή υπολογίζεται ότι 20 άνθρωποι θα χάνουν τη ζωή τους ανά λεπτό λόγω λοίμωξης από ανθεκτικά μικρόβια (εικόνες 5 και 6) [27].



Deaths attributable to antimicrobial resistance every year by 2050



Source: Review on Antimicrobial Resistance 2014

Εικόνα 5 : εκτιμώμενοι θάνατοι το 2050 και οι πιο συχνές αιτίες. Εικόνα 6: γεωγραφική κατανομή των θανάτων από ανθεκτικές λοιμώξεις το 2050, REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE 2014

Η υπερκατανάλωση αντιβιοτικών ή/και η μη αιτιολογημένη χρήση τους σε ανθρώπους και ζώα, η ελλιπής διαχείριση ανθρώπινων και ζωικών λυμάτων που μπορεί να εμπεριέχουν αντιβιοτικά κι απολυμαντικά (πχ από φαρμακοβιομηχανίες, νοσοκομεία, κτηνοτροφικές μονάδες) σε συνδυασμό με ανεπαρκή μέτρα ελέγχου λοιμώξεων σε πολλές χώρες συνετέλεσε στην εμφάνιση των πολυανθεκτικών στελεχών. Επιπρόσθετα, η ευκολία στη μετακίνηση ανθρώπων και στη διακίνηση αγαθών καθώς οι μαζικές μετακινήσεις πληθυσμών εξαιτίας εμπόλεμων καταστάσεων, φτώχειας ή φυσικών καταστροφών, η αστική μετανάστευση και ο στενός συγχρωτισμός σε περιοχές με ανεπαρκή συστήματα ύδρευσης και αποχέτευσης επιτείνουν τη διασπορά ανθεκτικών στελεχών μέσω υγιών φορέων [5,28-30,77,78]. Ο παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας σε συνεργασία με τη UNICEF εκτιμούν ότι το 36% του παγκόσμιου πληθυσμού ή 2,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι ή 1 στους 3 ανθρώπους ζουν σε ακατάλληλες υγειονομικές συνθήκες και δεν έχουν πρόσβαση σε βελτιωμένα συστήματα ύδρευσης και αποχέτευσης [5,79]. Σημαντικό ρόλο στη διασπορά ανθεκτικών μικροβίων κυρίως σε χώρες της Ν.Α. Ασίας και της Αφρικής παίζουν παλιές εμπεδωμένες συνήθειες όπως ο συγχρωτισμός ανθρώπων και ζώων, η βρώση φαγητού με τα χέρια και η πρακτική της ανοιχτής αφόδευσης

(open defecation). Το Μάιο του 2014, ο ΟΗΕ κήρυξε την έναρξη μιας νέας εκστρατείας για τον τερματισμό της πρακτικής της ανοιχτής αφόδευσης, συνθήκη περίπου 1 δισ. ανθρώπων (ή ένας στους 8 ανθρώπους) και τη βελτίωση της πρόσβασης σε τουαλέτες και αποχωρητήρια για τους 2,5 δισεκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο που στερούνται των βασικών εγκαταστάσεων υγιεινής (εικόνα 7) [80].



Εικόνα 7: οι ανάγκες σε βασικές υγειονομικές συνθήκες. Όσο μεγαλύτερος ο κύκλος, τόσο μεγαλύτερες οι ανάγκες.

Η μικροβιακή αντοχή είναι ,επομένως, πολυσύνθετο πρόβλημα και συνιστά σημαντική απειλή για τη Δημόσια Υγεία .Δεν γνωρίζει σύνορα κρατών και απαιτεί κατάλληλη διαχείριση τόσο σε επίπεδο ατομικής μέριμνας όσο και σε εθνικό και διεθνές επίπεδο λαμβάνοντας επιπλέον υπόψη ότι συνεχώς περιορίζονται οι θεραπευτικές επιλογές και ότι υπάρχει σοβαρή έλλειψη νέων αντιμικροβιακών. Έχουν περάσει σχεδόν 30 χρόνια από την τελευταία φορά που εισήχθη νέα τάξη αντιβιοτικών και μόνο 4 από τα 43 φάρμακα που βρίσκονται επί του παρόντος υπό ανάπτυξη φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα να δράσουν εναντίον της πλειονότητας των πολυανθεκτικών μικροβίων [31,32,133].

1.3 Αιτίες της αυξανόμενης μικροβιακής αντοχής

Η υπερκατανάλωση και η ακατάλληλη χρήση των αντιβιοτικών στους ανθρώπους , η εκτεταμένη χρήση τους στη ζωική και φυτική παραγωγή και η ελλιπής διαχείριση των λυμάτων συνεισφέρουν στην αυξανόμενη μικροβιακή αντοχή.

1.3.1. υπερκατανάλωση και ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών στους ανθρώπους

Η αυξανόμενη χρήση των αντιμικροβιακών από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, όταν αυτά εμφανίστηκαν στην καταναλωτική αγορά, οδήγησε στην επίταση του φαινομένου της πίεσης επιλογής (selective pressure). Η πίεση επιλογής συμβαίνει φυσιολογικά. Είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος , τον οποίο έχουν τα μικρόβια για να προσαρμόζονται σε ένα οικολογικό περιβάλλον που συνεχώς μεταβάλλεται. Προϋπάρχει του ανθρώπινου γένους και για αρκετές χιλιετίδες ακολουθούσε ένα σχετικά βραδύ ρυθμό. Όμως με την εκτεταμένη κατανάλωση των αντιβιοτικών (antibiotic overuse) ή/και με την ακατάλληλη χρήση τους (antibiotic misuse) , το φαινόμενο εντάθηκε. Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν την άμεση σχέση μεταξύ της κατανάλωσης και της ανάδειξης και διασποράς ανθεκτικών στελεχών [33,34]. Δεν είναι διόλου τυχαίο που ο Σερ Αλεξάντερ Φλέμινγκ, που ανακάλυψε την πενικιλίνη το 1928 , στην ομιλία του κατά τη βράβευσή του με το Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1945 προειδοποιούσε «να μη χρησιμοποιείται το αντιβιοτικό παρά μόνο όταν υπάρχει ορθά διαγνωσμένη αιτία, και όταν χρησιμοποιείται να χορηγείται σε αρκετή ποσότητα και για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα, γιατί αλλιώς δίνεται η ευκαιρία στα βακτήρια να αναπτύξουν ανθεκτικά στελέχη τους ως προς το συγκεκριμένο φάρμακο» [35].

Παρά τις προειδοποιήσεις , γιατροί και ασθενείς δεν φαίνεται να κατανοούν το πρόβλημα και τα αντιβιοτικά εξακολουθούν να είναι τα πιο συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως. Επίσης, σε πολλές χώρες κυρίως χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος (LMICs) η κατανάλωση των αντιβιοτικών γίνεται χωρίς συνταγογράφηση και άνευ νομοθετικού πλαισίου , ενώ μέσω του διαδικτύου μπορεί κάποιος εύκολα να προμηθευτεί το φάρμακο ,ακόμα και αν είναι πολίτης χώρας με αυστηρό κανονισμό. Η προμήθεια των αντιβιοτικών χωρίς συνταγή κυμαίνεται από 19-100% σε χώρες εκτός της Βόρειας Αμερικής και της Βόρειας

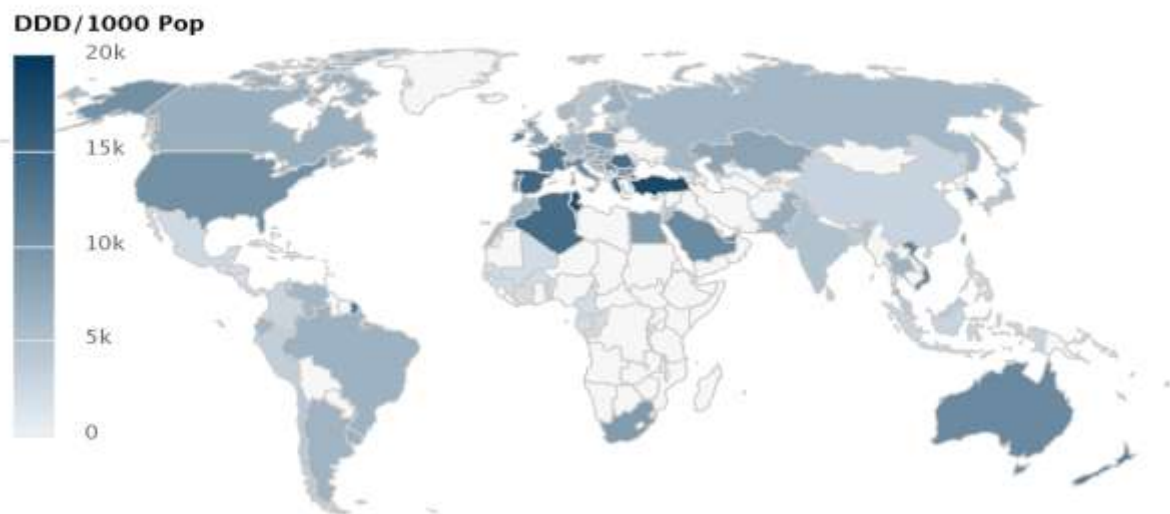
Ευρώπης[36].Μερικοί άλλοι παράγοντες που συντηρούν το φαινόμενο της υπερσυνταγογράφησης-υπερκατανάλωσης αντιβιοτικών είναι ο ανταγωνισμός μεταξύ των επαγγελματιών υγείας συνδυασμένος με την προσμονή των ασθενών να τους δώσει ο γιατρός τους φάρμακο, η αυτοθεραπεία και η λήψη αντιβιοτικού κατόπιν σύστασης γνωστών ή φαρμακοποιού, η χρηματοδότηση των γιατρών από τις φαρμακευτικές εταιρείες, η έλλειψη άμεσων και χαμηλού κόστους διαγνωστικών τεχνικών ώστε η αγωγή να είναι στοχευμένη στο μικροβιακό αίτιο και όχι εμπειρική. Το CDC υπολογίζει ότι το 30- 50% των αντιβιοτικών που συνταγογραφούνται στις ΗΠΑ δεν είναι απαραίτητα, γιατί πρόκειται πχ για ιώσεις , με ετήσιο κόστος 1,1 δισ. δολάρια [3,19]. Σε δημοσκόπηση που έγινε το 2008 στην Ευρωπαϊκή Ένωση μόνο το 36% των ερωτηθέντων απάντησε σωστά ότι τα αντιβιοτικά είναι αναποτελεσματικά στις ιώσεις. Στο πρόσφατο Ευρωβαρόμετρο (Απρίλιος 2016) το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο 46%. Το 2015, σε αντίστοιχη πολυεθνική έρευνα που διεξήχθη από τον Π.Ο.Υ. , το ποσοστό ήταν 36% [37, 38,97].

Υπολογίζεται ότι κατά τη δεκαετία 2000-2010 η παγκόσμια κατανάλωση των αντιβιοτικών αυξήθηκε κατά 36% και παράλληλα αυξήθηκαν τα ποσοστά της μικροβιακής αντοχής σε τέτοια επίπεδα ώστε να υπάρχουν είδη μικροβίων για τα οποία δεν υπάρχει κανένα διαθέσιμο δραστικό φάρμακο [39]. Χώρες όπως η Βραζιλία ,η Ρωσία, η Ινδία, η Κίνα, και η Νότια Αφρική (οι αποκαλούμενες BRICS) εμφάνισαν την υψηλότερη ποσοστιαία μεταβολή .Ο μέσος όρος των ποσοστιαίων μεταβολών τους είναι 70%. Εντυπωσιακή άνοδο εμφάνισαν η Τουρκία, η Αίγυπτος , η Ουρουγουάη και χώρες της Δυτικής Αφρικής , όπως η Μαυριτανία, το Μάλι η Σενεγάλη, η Ακτή Ελεφαντοστού. Οι περισσότερες από τις χώρες που το 2000-2010 μείωσαν ή διατήρησαν στα ίδια επίπεδα την κατανάλωση ήταν χώρες υψηλού εισοδήματος (Upper Income countries, UICs) , όπως οι ΗΠΑ και αρκετές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης [40] .

Η παγκόσμια αυξητική τάση στη χρήση των αντιβιοτικών εκτιμάται ότι θα εξακολουθήσει να χαρακτηρίζει και τα επόμενα χρόνια , καθώς ο πληθυσμός της γης μεγαλώνει και οι κάτοικοι των LMICs θα έχουν πρόσβαση στα φάρμακα και σε παρόχους υπηρεσιών υγείας ολοένα και περισσότερο. Τα προαναφερθέντα στοιχεία , που συλλέχθηκαν από το CDDEP, αποτυπώνονται στις εικόνες 8 και 9[41].

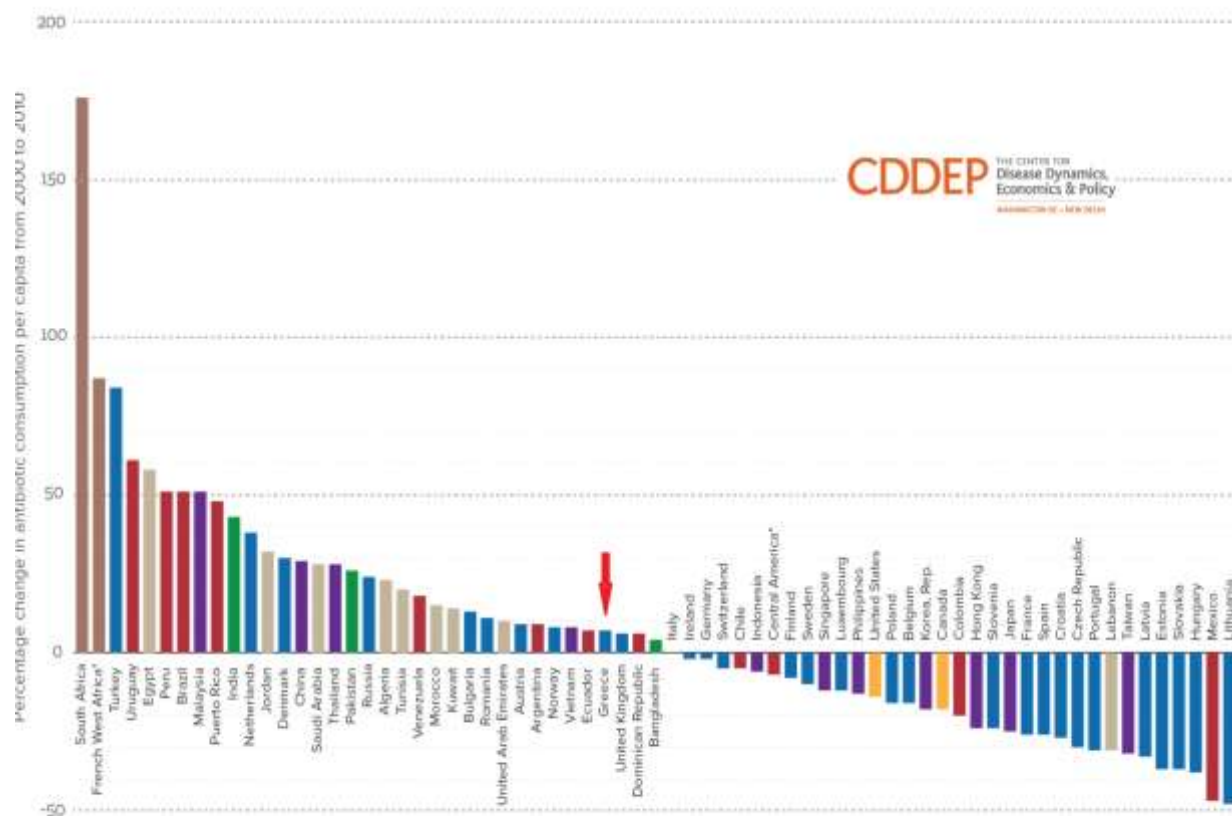
Use of All Antibiotics in 2015

Source: IMS Health



Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org)

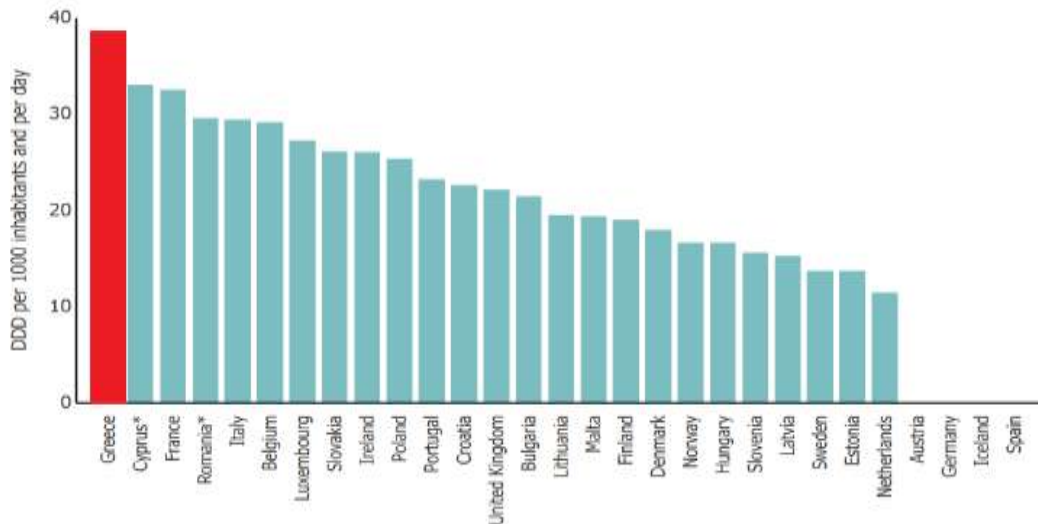
Εικόνα 8: ο παγκόσμιος χάρτης της κατανάλωσης αντιβιοτικών το 2015, CDDEP



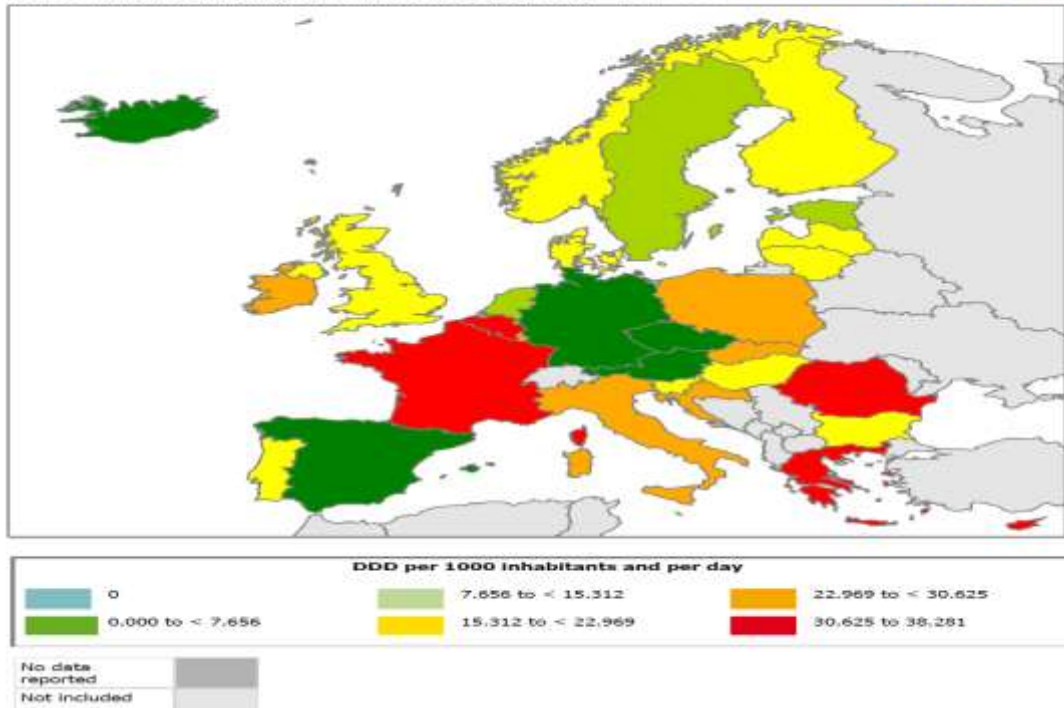
Εικόνα 9: οι ποσοστιαίες μεταβολές στην κατανάλωση αντιβιοτικών τη δεκαετία 2000-2010. Χώρες υψηλού εισοδήματος εμφάνισαν σταθερότητα ή μείωση, σε αντίθεση με τις χώρες BRICS που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση, CDDEP

Στην Ευρώπη ,σύμφωνα με τα στοιχεία του ECDC, την πρώτη θέση στην κατανάλωση αντιμικροβιακών στην κοινότητα και στο νοσοκομειακό χώρο εξακολουθεί να κατέχει η Ελλάδα. Αν και κατά το διάστημα 2009-2013 παρουσίαζε αξιοσημείωτη πτωτική πορεία, από το 2014 και έπειτα παρατηρήθηκε πάλι αύξηση (εικόνα 10) [42] .

Consumption of Antibacterials for systemic use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Europe, reporting year 2016

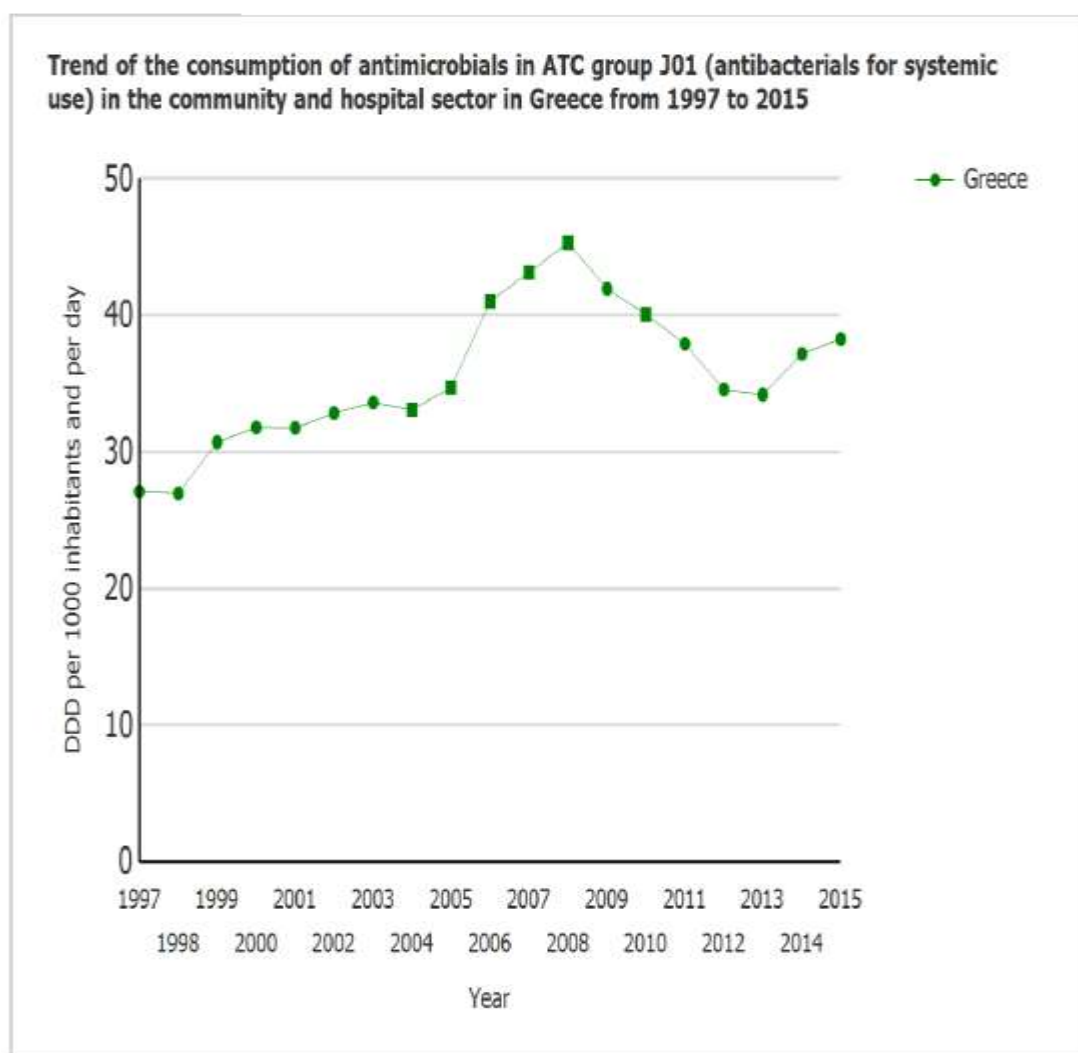


Consumption of Antibacterials For Systemic Use (ATC group J01) in the community and hospital sector in Europe, reporting year 2015



εικόνα 10: Η κατανάλωση αντιβιοτικών στην Ευρώπη το 2015και το 2016. Η Ελλάδα κατακτά την πρώτη θέση. Στοιχεία από ECDC.

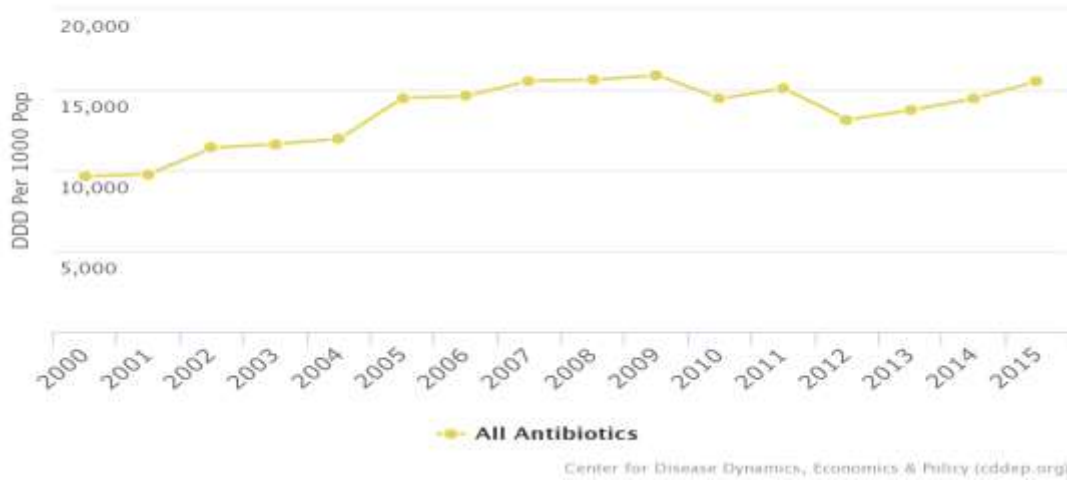
Η κατανάλωση των αντιβιοτικών εκτιμάται κυρίως με 2 μετρικά συστήματα : σε Daily Defined Doses (DDD) και σε Standard Units (SU). Η DDD είναι η υποθετική μέση δόση συντήρησης ανά ημέρα για ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την κύρια ένδειξη του σε έναν ενήλικο 70 kg. Είναι ένα εργαλείο που προτάθηκε από το WHO. Μπορεί να δώσει μια πρόχειρη εκτίμηση της κατανάλωσης και όχι μια ακριβή εικόνα της πραγματικής χρήσης. Πρόκειται δηλαδή για μία τεχνική μονάδα μέτρησης που επιτρέπει συγκρίσεις [43] . Η καταγραφή σε Πρότυπες Μονάδες (Standard Units) καθρεφτίζει τον ακριβή αριθμό των αντιβιοτικών που πουλήθηκαν στο λιανεμπόριο και στα φαρμακεία των νοσοκομείων τη δεδομένη χρονική περίοδο. Μία Standard Unit αντιπροσωπεύει ένα χάπι, μία κάψουλα ή μια αμπούλα (εικόνες 11,12,13) [41].



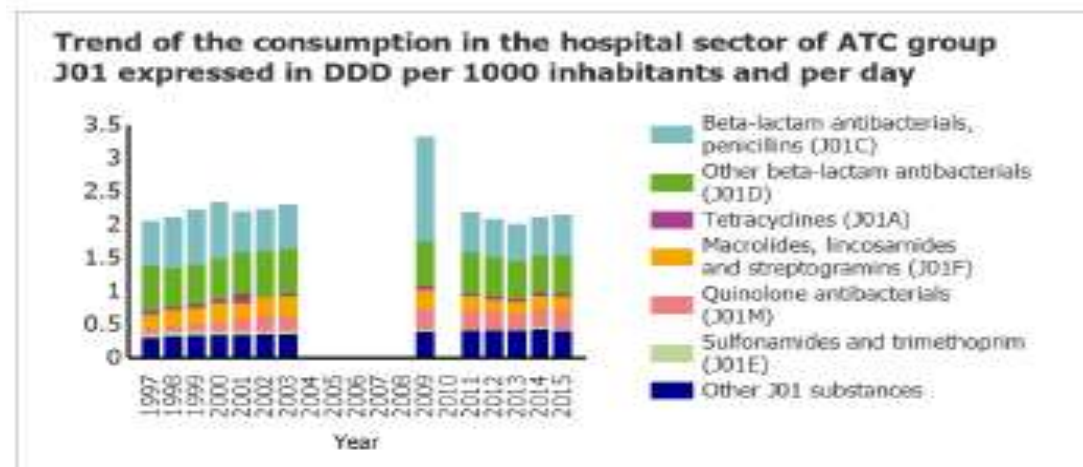
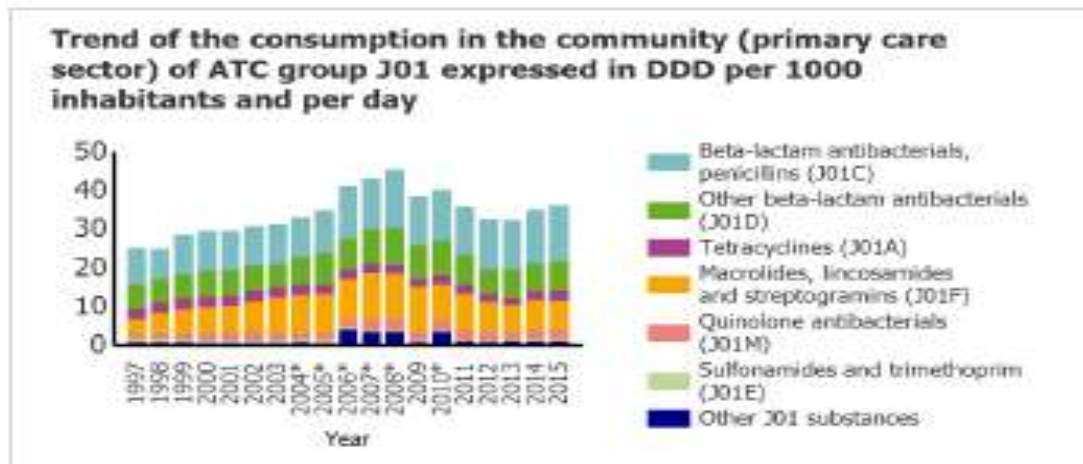
εικόνα 11: Καταγραφή της κατανάλωσης αντιβιοτικών στην Ελλάδα σε DDD ανά 1000 κατοίκους και ανά μέρα , το διάστημα 1997-2015 , στην κοινότητα και στο νοσοκομειακό χώρο , στοιχεία ECDC.

Antibiotic Use in Greece

Source: IMS Health



εικόνα 12: πορεία της κατανάλωσης αντιβιοτικών σε DDD ανά 1000 κατοίκους , το διάστημα 2000-2015 στην Ελλάδα, στοιχεία από CDDEP - IMS Health.



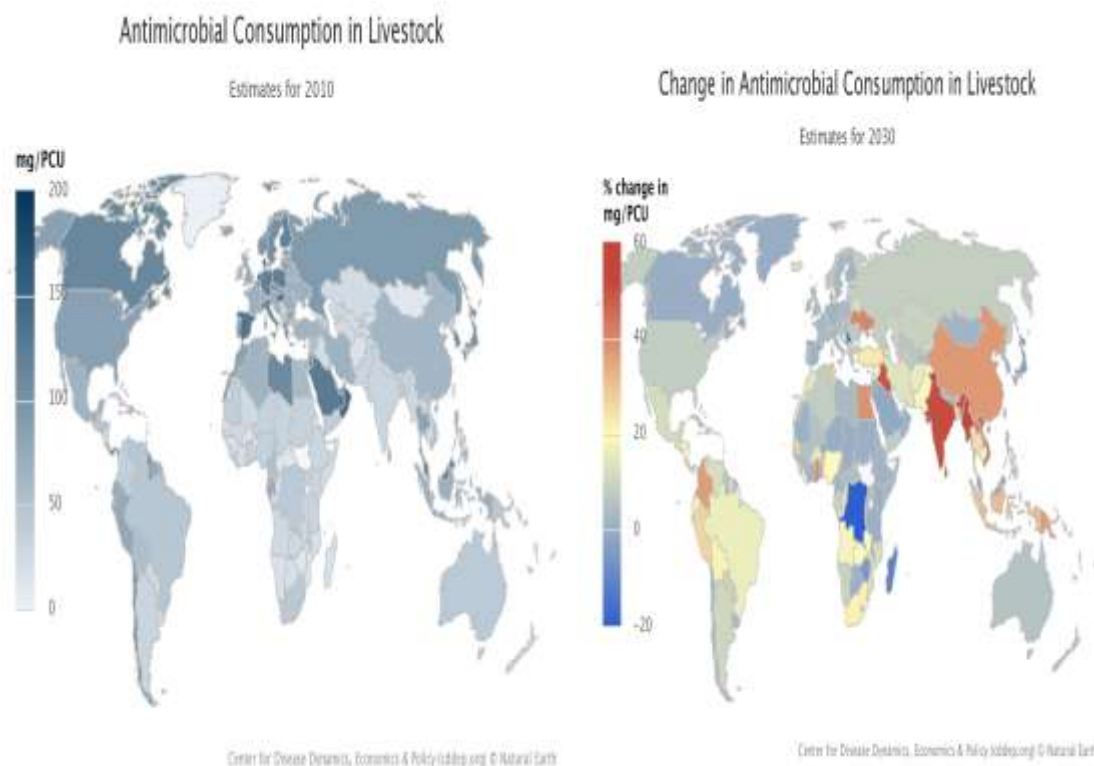
εικόνα 13 :Καταγραφή της κατανάλωσης αντιβιοτικών στην κοινότητα και στο νοσοκομείο ανά τάξη φαρμάκου ,στην Ελλάδα το 1997-2015, σε DDD /1000 κατοίκους και ανά ημέρα

1.3.2 Χρήση αντιβιοτικών στη ζωοτροφία και τη γεωργία

Οι τάξεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στη ζωική και γεωργική παραγωγή είναι ως επί το πλείστον ίδιες με αυτές που προορίζονται για θεραπευτική χρήση στους ανθρώπους. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής καθίσταται πιο περίπλοκο λόγω της υπερβολικής χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, τις ιχθυοκαλλιέργειες και τη γεωργία με συνέπεια την ανάδυση και διασπορά ανθεκτικών στελεχών στο φυσικό περιβάλλον και στα ζώα και τη μεταφορά αυτών στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας ή/και της άμεσης επαφής [8,19,27,76,208]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση του γλυκοπεπτιδίου *avoparcin* στις ζωοτροφές, γεγονός που είχε σαν επακόλουθο την εμφάνιση ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων (*Vancomycin Resistant Enterococci*, VRE) αρχικά στα ζώα και στη συνέχεια στον άνθρωπο [44]. Μετά την απαγόρευση της χρήσης της *avoparcin* στις ζωοτροφές το 1997 από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ελαττώθηκαν και οι λοιμώξεις από VRE σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες [45]. Τα αντιβιοτικά στη ζωική παραγωγή δεν χρησιμοποιούνται μόνο για τη θεραπεία των άρρωστων ζώων. Χρησιμοποιούνται ως παράγοντες πάχυνσης ή ως αυξητικοί παράγοντες [46]. Μελέτες δείχνουν ότι η χορήγηση αντιβιοτικών για την πάχυνση των ζώων δημιουργεί ιδανικές συνθήκες για την εμφάνιση και την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων στα ζώα [110]. Μια πρόσφατη μελέτη από επτά ευρωπαϊκές χώρες έδειξε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης οκτώ κατηγοριών αντιμικροβιακών και της επικράτησης ανθεκτικών στελεχών *E.coli* σε χοίρους, πουλερικά, και βοοειδή [110].

Σε πολλές χώρες η συνολική ποσότητα των χρησιμοποιούμενων στη ζωοτροφία αντιβιοτικών υπερβαίνει κατά πολύ την ποσότητα που χρησιμοποιείται στη θεραπεία λοιμώξεων στους ανθρώπους. Σύμφωνα με το CDC, το 80% των αντιβιοτικών που πουλήθηκαν το 2013 στις ΗΠΑ προορίζονταν για χρήση στην κτηνοτροφία [19]. Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι οι ΗΠΑ την 5ετία 2009-2014 παρουσίασαν αύξηση στη χρήση αντιβιοτικών στα ζώα, ιδιαίτερα των τετρακυκλινών, αμινογλυκοσιδών, κεφαλοσπορινών και λινκοζαμινών [47]. Το CDDEP εκτιμά ότι το 2010 παγκοσμίως καταναλώθηκαν στην κτηνοτροφία 63,151 τόνοι. Η Κίνα, οι ΗΠΑ, η Βραζιλία, η Γερμανία και η Ινδία είναι οι μεγαλύτεροι καταναλωτές,

έχοντας συλλογικά καταναλώσει περίπου το ήμισυ του παγκόσμιου συνόλου. Με βάση τις τρέχουσες τάσεις, το CDDEP εκτιμά ότι η συνολική κατανάλωση στα ζώα θα αυξηθεί κατά 67% μέχρι το 2030, με τις Βραζιλία, Ρωσία, Ινδία, Κίνα και Νότια Αφρική να κατακτούν την πρωτοκαθεδρία και να διπλασιάζουν το ήδη υψηλό ποσοστό τους (εικόνα 14) [47].



εικόνα 14 : (α)κατανάλωση αντιβιοτικών στα ζώα το 2010 (β) εκτιμάται αύξηση κατά 67% μέχρι το 2030, με τις Βραζιλία, Ρωσία, Ινδία, Κίνα και Νότια Αφρική να διπλασιάζουν το ποσοστό τους, CDDEP

Στις χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος χώρες (LMICs), παρατηρείται μια άνευ προηγουμένου αύξηση της ζήτησης για ζωική πρωτεΐνη και, ως εκ τούτου, η συνολική βιομάζα των ζώων που εκτρέφονται υπερβαίνει πλέον τη παγκόσμια βιομάζα των ανθρώπων [112]. Στην Κίνα, η ημερήσια πρόσληψη ζωικής πρωτεΐνης αυξήθηκε από 7 γραμμάρια ανά κάτοικο ανά ημέρα το 1960 σε 25 γραμμάρια ανά κάτοικο ανά ημέρα το 2013, ενώ η παραδοσιακή διαίτα με ρύζι και σιτάρι προοδευτικά μειώθηκε, κυρίως μεταξύ των ενηλίκων υψηλότερου εισοδήματος και των νέων [113]. Για να ικανοποιηθεί η ζήτηση αυτή, οι χώρες BRICS έχουν στραφεί στην εντατική κτηνοτροφία, που συνιστά άκρως επικερδή επένδυση. Εν τω μεταξύ, ολοένα και συχνότερα απομονώνονται ανθεκτικά βακτήρια σε κτηνοτροφικές μονάδες στις χώρες αυτές [114,115].

Η Κίνα, όπως έχει ήδη ειπωθεί, είναι μία χώρα με ευρεία χρήση αντιβιοτικών στη ζωοτροφία. Η χρήση αντιβιοτικών είναι ακόμη ανεξέλεγκτη ,χωρίς να έχει τεθεί υπό κρατική ρύθμιση και επίβλεψη [41,48]. Συνιστά το μεγαλύτερο καταναλωτή κολιστίνης παγκοσμίως, με 12000 τόνους το 2015. Η κολιστίνη αποτελεί ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται παραδοσιακά στην κτηνιατρική για την πρόληψη και αντιμετώπιση διαρροϊκών νόσων στη χοιροτροφία και την ορνιθοτροφία. Για τον άνθρωπο όμως αποτελεί τη μία από τις δύο εναπομείνουσες θεραπευτικές επιλογές όταν πρόκειται για πολυανθεκτικές λοιμώξεις. Δεν είναι διόλου παράξενο που εκεί ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά , στις 18 Νοέμβριου 2015, το πλασμιδιακό γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη *mcr-1* σε ζώα παραγωγής, σε κρέατα και λαχανικά , στο περιβάλλον (ποτάμια) και σε ανθρώπους [49,50].

Η Ε.Ε. απαγόρευσε τη χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων το 2003 [48]. Στις ΗΠΑ , ο Οργανισμός Τροφίμων και φαρμάκων (FDA) το 2007 ανακάλεσε την έγκριση για τη χρήση κινολονών στην ορνιθοτροφία εξαιτίας της ανάδυσης στους ανθρώπους λοιμώξεων από ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες στελέχη *Campylobacter*. Η απόφαση ήρθε με καθυστέρηση 7 ετών λόγω νομικών παρακωλύσεων που πρόβαλλαν οι βιομηχανίες. Το 2013, ο FDA ανακοίνωσε την πρόθεση της σταδιακής κατάργησης της χρήσης των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων [19].

Όσον αφορά στη γεωργία ,η εκτενής χρήση των αντιβιοτικών και των φυσικών λιπασμάτων επηρεάζει τη μικροβιολογία του εδαφικού και υδάτινου περιβάλλοντος. Το 90% των αντιβιοτικών που δίνονται στα ζώα αποβάλλονται στα ούρα και στα κόπρανά τους, κατόπιν διασπείρονται μέσω των φυσικών λιπασμάτων (κοπριά) στο έδαφος, στα υπόγεια και στα επιφανειακά ύδατα. Από τη στιγμή που ένα αντιβιοτικό εισάγεται σε ένα οικοσύστημα μπορεί να επηρεάσει τους βακτηριακούς πληθυσμούς. Στην κοπριά ,εκτός από τα αντιβιοτικά, είναι δυνατόν να υπάρχουν οι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί που έχουν τυχόν αποικίσει το έντερο των ζώων [19,51,52,53].

Η χρήση, επομένως, των τεράστιων ποσοτήτων αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, στις ιχθυοκαλλιέργειες και στη γεωργία επιτείνει το φαινόμενο της πίεσης επιλογής . Επιπλέον με τα ζωικά λύματα και τις γεωργικές απορροές

απελευθερώνονται ακούσια στο περιβάλλον γονίδια αντοχής. Ο συνδυασμός αυτών των δύο παραγόντων οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο ,άμεσο ή έμμεσο, για την ανθρώπινη υγεία [8,19,27,52,54].

1.3.3 Ρύπανση από αντιβιοτικά , φαρμακευτικές εταιρείες και εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων .

Αντιβιοτικά, γονίδια αντοχής και ανθεκτικά στελέχη δεν διασπείρονται στο περιβάλλον μόνο εξαιτίας της βιομηχανικής παραγωγής ζωικών και φυτικών τροφίμων. Μια παραγνωρισμένη οδός είναι η φαρμακευτική ρύπανση και η ελλιπής επεξεργασία των ανθρώπινων και ζωικών λυμάτων [5,19,68,74]. Μελέτη το 2013, που εξετάζει τη φαρμακευτική ρύπανση σε πυκνοκατοικημένες χώρες της Ασίας, συμπεριλαμβανομένων της Κίνας, της Ινδίας, του Μπαγκλαντές και του Πακιστάν, περιέγραψε ως σοβαρή απειλή τη μετεγκατάσταση της παραγωγής των αντιβιοτικών στις χώρες αυτές λόγω χαμηλού κόστους [55]. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η πλειονότητα των εξεταζόμενων εγκαταστάσεων παραγωγής δεν συμμορφώνεται με την περιβαλλοντική ρύθμιση και τα φαρμακευτικά λύματα αποβάλλονται χωρίς καμία επεξεργασία στο κοινοτικό αποχετευτικό σύστημα, εκθέτοντας έτσι σε ανθεκτικά μικρόβια τους γηγενείς και τα ζώα, μέσω των αερολυμάτων, του νερού και των καλλιεργειών, και την παγκόσμια κοινότητα μέσω των ταξιδιών, των μετακινήσεων και της διακίνησης αγαθών. Στην Ινδία και το Πακιστάν μόνο, εκτιμάται ότι περισσότεροι από 200 εκατομμύρια άνθρωποι είναι αποικισμένοι με στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες [5].

Τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά κατασκευάζονται με σύμβαση στην Κίνα και την Ινδία, με εξωτερική ανάθεση από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες που η πλειοψηφία τους έχει έδρα στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Υπολογίζεται ότι το 40% της παγκόσμιας παραγωγής αντιβιοτικών γίνεται στην Ινδία. Η ρύπανση του Ινδικού περιβάλλοντος από αντιβιοτικά είναι εκσεσημασμένη. Μετρήσεις σε περιοχές πλησίον των εγκαταστάσεων των βιομηχανιών κατασκευής και μεταποίησης αντιβιοτικών φανέρωσαν ότι τα επίπεδα των αντιβιοτικών στα δείγματα νερού ήταν υψηλότερα από εκείνα που παρατηρούνται σε δείγματα ορού ασθενών που λάμβαναν το φάρμακο ως θεραπεία [56]. Σε άλλες μελέτες φάνηκε ότι η συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης ήταν περίπου 1 εκατομμύριο φορές μεγαλύτερη

από εκείνη που τυπικά παρατηρείται στα επεξεργασμένα απόβλητα στην Ευρώπη[57]. Η εκτιμώμενη συνολική ποσότητα σιπροφλοξασίνης που καθημερινά απέρριπτε μία φαρμακευτική βιομηχανία στην Ινδία στο κοντινό της ποταμό ήταν 44 kg, η οποία ισοδυναμεί με κατανάλωσή του αντιβιοτικού τουλάχιστον 5 ημερών σε ολόκληρη τη Σουηδία [58]. Μελέτες παρακολούθησης (Follow up) έδειξαν ότι είχαν ρυπανθεί σε πρωτοφανή επίπεδα από τα φαρμακευτικά απόβλητα ο ποταμός, το έδαφος και το πόσιμο ύδωρ [59,60]. Το 2014 στη λίμνη Kazirally, η οποία βρίσκεται στα κεντρικά της Ινδίας και επηρεάζεται από την άμεση απόρριψη των φαρμακευτικών αποβλήτων, διαπιστώθηκε η παρουσία μιας ευρείας γκάμας γονιδίων αντοχής σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά καθώς και γονιδίων κινητοποίησης του γενετικού υλικού (προσδιορίστηκαν 81 τύποι γονιδίων). Εκτιμάται ότι η λίμνη αυτή περιέχει 7.000 φορές περισσότερα γονίδια αντοχής από ό,τι η Σουηδική λίμνη με την οποία συγκρίθηκε, όπου εντοπίστηκαν μόνο οκτώ τύποι γονιδίων αντοχής [61]. Εξέταση σε 171 δείγματα υδάτινων απορροών και σε 50 δείγματα πόσιμου ύδατος στο Νέο Δελχί, πρωτεύουσα της Ινδίας, εντόπισε την καρβαπενεμάση NDM-1 σε 2 από τα 50 δείγματα πόσιμου νερού και σε 51 από τα 171 δείγματα υδάτινων απορροών[62]. Η NDM-1 είναι η νεώτερη μέταλλο-β-λακταμάση, ανακαλύφθηκε το 2008, και έχει εντοπιστεί έκτοτε σε περισσότερες από 70 χώρες, αποδεικνύοντας για άλλη μια φορά πόσο γρήγορα «ταξιδεύει» η μικροβιακή αντοχή[63,64].

Μία πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση, το νέφος, συνιστά πιο σημαντική δεξαμενή και οδό εξάπλωσης των γονιδίων αντοχής και των ανθεκτικών μικροβίων από ό,τι θεωρείτο μέχρι σήμερα [70]. Είναι γνωστό ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση συμβάλλει σε μια σειρά από προβλήματα υγείας, όπως πχ καρδιοπάθεια, αναπνευστικές παθήσεις. Η μελέτη αυτή καταδεικνύει ότι το νέφος μπορεί να συμβάλλει στη μικροβιακή αντοχή καθώς διαπιστώθηκε ποικιλότητα σε γονίδια αντοχής, τα οποία δύνανται εν συνεχεία να μεταφερθούν σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Δείγματα αέρα που συνελέγησαν στο Πεκίνο, πρωτεύουσα της Κίνας, σε μία περίοδο βαριάς αιθαλομίχλης που διήρκησε 5 ημέρες (10-14 Γενάρη 2013) [71], περιείχαν πολλά και ποικίλα γονίδια αντοχής, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που προσδίδουν αντοχή στις καρβαπενέμες. Η αφθονία τους σε γονίδια αντοχής ήταν ωστόσο στο ίδιο επίπεδο με αυτή του ανθρώπινου εντέρου και των

λυμάτων. Οι μικροβιακές κοινότητες από το νέφος του Πεκίνου είχαν υψηλότερη ποικιλία στους τύπους γονιδίων αντοχής (64,4 διαφορετικοί τύποι), εμφάνιζαν όμως παρόμοια συγκέντρωση, σε σύγκριση με δείγματα αέρα που ελήφθησαν στη Νέα Υόρκη[72]. Το νέφος θεωρείται ως μια αντανάκλαση του αστικού αέρα που έρχεται σε άμεση επαφή με πολλούς άλλους τύπους περιβαλλόντων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που έχουν φαρμακευτική ρύπανση ή συγκεντρώσεις λυμάτων, με συνέπεια να συσσωρεύεται μια ποικιλόμορφη συλλογή βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών, όπως υποδεικνύεται από την ποικιλότητα των τύπων γονιδίων αντοχής σε αυτά τα δείγματα. Ανθεκτικά βακτήρια έχουν εντοπιστεί στον αέρα κτηνοτροφικών μονάδων και σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων [73,74].

Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (Sewage Treatment Plants,STPs) μπορούν να αποτελούν εξαιρετικό hotspot για την οριζόντια μεταβίβαση γονιδίων αντοχής (Horizontal Gene Transfer,HGT)[69]. Οι συνθήκες στα σημεία αυτά ευνοούν την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών, γιατί συνεχώς καταφθάνουν αντιβιοτικά και απολυμαντικά, και καθώς δεν εφαρμόζονται ακόμα μέθοδοι απενεργοποίησης τους αυτά ασκούν πίεση επιλογής. Καταφθάνουν, επίσης, ανθεκτικά στελέχη με τα λύματα ανθρώπων και ζώων, αποικισμένων ή νοσούντων. Οι συγκεντρώσεις των μικροβίων στις εγκαταστάσεις είναι πυκνές [5,65,66]. Επιστήμονες συμπεραίνουν ότι 4-5 ανθεκτικά βακτήρια εγκαταλείπουν το σταθμό επεξεργασίας για κάθε ένα βακτήριο που καταφθάνει σε αυτόν [67]. Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε την παρουσία NDM-1 σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στη Βόρεια Κίνα [67]. Το Ερευνητικό Συμβούλιο της Σουηδίας αποφάσισε να χρηματοδοτήσει ερευνητές του Πανεπιστημίου του Γκέτεμποργκ να μελετήσουν τα ευρωπαϊκά εργοστάσια επεξεργασίας λυμάτων, ως πιθανή πηγή για τα γονίδια μικροβιακής αντοχής.

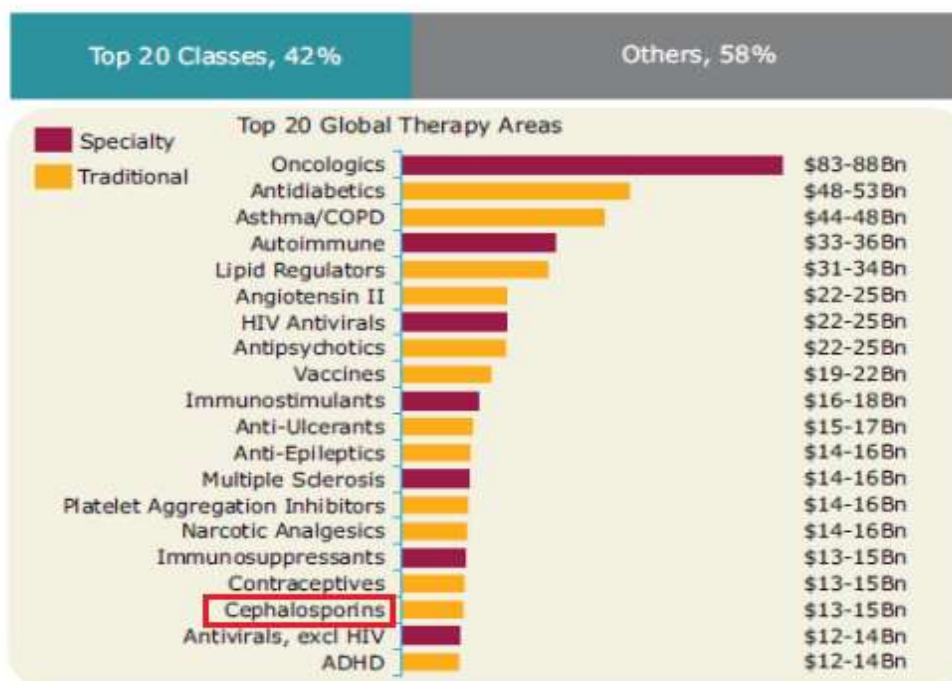
1.4 Έλλειψη νέων αντιμικροβιακών – στασιμότητα στην έρευνα και ανάπτυξη

Η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών αποτελεί ένα έργο επίπονο, αλλά εξαιρετικά ακανθώδες γιατί αφενός τα διαθέσιμα σήμερα αντιμικροβιακά καθίστανται όλο και περισσότερο αναποτελεσματικά, συνεπεία της μικροβιακής αντοχής, αφετέρου αρκετές φαρμακοβιομηχανίες έχουν αποσυρθεί από αυτό το πεδίο έρευνας, γιατί τα αντιβιοτικά δεν είναι προσοδοφόρα. Η ανθρωπότητα είναι αντιμέτωπη με το

ενδεχόμενο ενός μέλλοντος χωρίς αποτελεσματικά αντιβιοτικά (post-antibiotic era) . Αυτό θα άλλαζε ριζικά τον τρόπο που ασκείται η σύγχρονη ιατρική. Τίθενται σε κίνδυνο όχι μόνο η έκβαση της θεραπείας για κοινές ασθένειες, όπως λοιμώξεις του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος ,αλλά και η έκβαση ιατρικών πράξεων και παρεμβάσεων, όπως οι μεταμοσχεύσεις, τα μείζονα χειρουργεία, οι επεμβάσεις αντικατάστασης, η χημειοθεραπεία του καρκίνου και του AIDS, η αιμοδιάλυση, η διαχείριση επιπλοκών της προωρότητας κοκ [3,4,5,19] .

Οι φαρμακευτικές εταιρείες έχουν στραφεί ως επί το πλείστον στην έρευνα και ανάπτυξη ογκολογικών φαρμάκων και φαρμάκων για χρόνιες παθήσεις .Το 2016, το 40% περίπου των ετήσιων φαρμακευτικών δαπανών στις ΗΠΑ αφορούσε ογκολογικά, αντιδιαβητικά, ανοσοτροποποιητικά, αντιϋπερτασικά, ψυχιατρικά και φάρμακα λοιπών χρόνιων παθήσεων. Τα αντιβακτηριακά φάρμακα είχαν μικρό μερίδιο στις δαπάνες, με τις κεφαλοσπορίνες να είναι ο μοναδικός εκπρόσωπός τους στην πρώτη εικοσάδα, κατέχοντας περίπου το 2,9% των συνολικών ετήσιων φαρμακευτικών δαπανών (εικόνα 15).

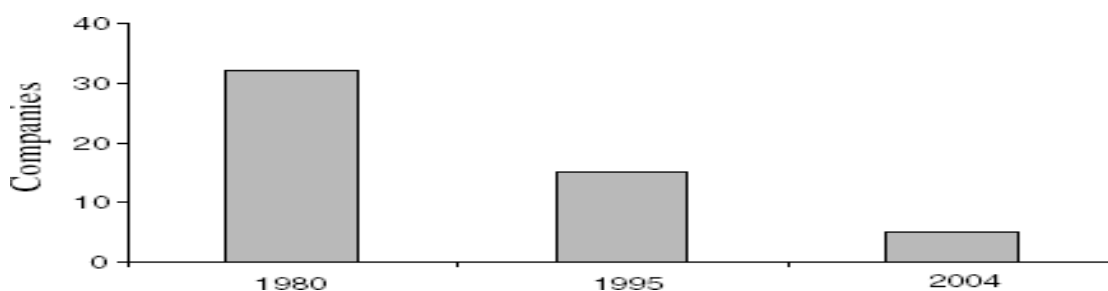
φαρμακευτικές δαπάνες το 2016



Source: IMS Institute for Healthcare Informatics, May 2012.

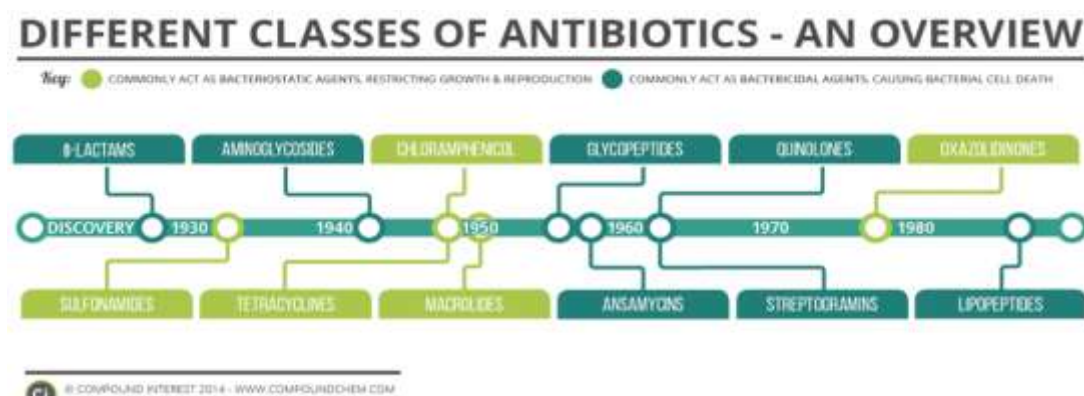
εικόνα 15: καταμερισμός των 20 κορυφαίων φαρμακευτικών δαπανών στις ΗΠΑ το 2016

Στο διάστημα μιας δεκαετίας, 15 από τις 18 μεγαλύτερες φαρμακευτικές εταιρείες εγκατέλειψαν τον τομέα ανακάλυψης αντιβιοτικών (εικόνα 16) . Οι λόγοι που οι βιομηχανίες έχουν αποσυρθεί είναι πολλαπλοί: α) η πιθανή μικρή διάρκεια χρήσης φαρμάκου, γιατί είναι σύνηθες το φαινόμενο να παρατηρείται αντοχή σχετικά σύντομα από την εισαγωγή του αντιβιοτικού στη θεραπευτική β) φαίνεται ότι έχουν εξαντληθεί οι δυνατότητες των μεθοδολογιών και των χημικών βιβλιοθηκών , που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Ο εμπλουτισμός τους και η επινόηση νέων συνιστά μια χρονοβόρα, δαπανηρή και αμφιβόλου αποτελεσματικότητας διαδικασία. γ) τα αντιβιοτικά χορηγούνται ως επί το πλείστον σε βραχυχρόνια σχήματα και θεραπεύουν, επιτυγχάνουν το στόχο τους απαλλάσσοντας το άτομο από μία συγκεκριμένη λοίμωξη οριστικά και γρήγορα. Οι εταιρείες μπορούν να έχουν περισσότερα κέρδη όταν πωλούν φάρμακα που λαμβάνονται καθημερινά για το υπόλοιπο της ζωής του ασθενούς (πχ για υπέρταση, χοληστερόλη, σακχαρώδη διαβήτη, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, αρθρίτιδα, άνοια) συνεκτιμώντας το γεγονός ότι ο πληθυσμός αυξάνεται και ο μέσος όρος ζωής παρατείνεται δ) Επίσης, οι τιμές για τα αντιβιοτικά δεν είναι συνήθως ανταγωνιστικές σε σχέση με άλλα φάρμακα όπως πχ τα αντικαρκινικά ε) Για κάθε νέο αντιβιοτικό που αρχίζει να κυκλοφορεί καταβάλλονται προσπάθειες διαφύλαξής του στο πλαίσιο στρατηγικών επιτήρησης, ώστε να μπορέσει να διατηρηθεί αποτελεσματικό για αρκετό διάστημα. Έτσι ,στα πρώτα χρόνια μετά την είσοδο του στην αγορά οι πωλήσεις είναι περιορισμένες στ) οι υψηλές απαιτήσεις των εθνικών οργανισμών (πχ FDA) στο σχεδιασμό των πειραματικών και κλινικών μελετών , για να λάβουν έγκριση τα αντιβιοτικά ,αποτρέπουν περαιτέρω τις βιομηχανίες ζ) η έρευνα έχει στραφεί σε άλλες πιθανές εναλλακτικές θεραπείες μετά τη δυναμική είσοδο της γονιδιωματικής (genomics) [83,84] .



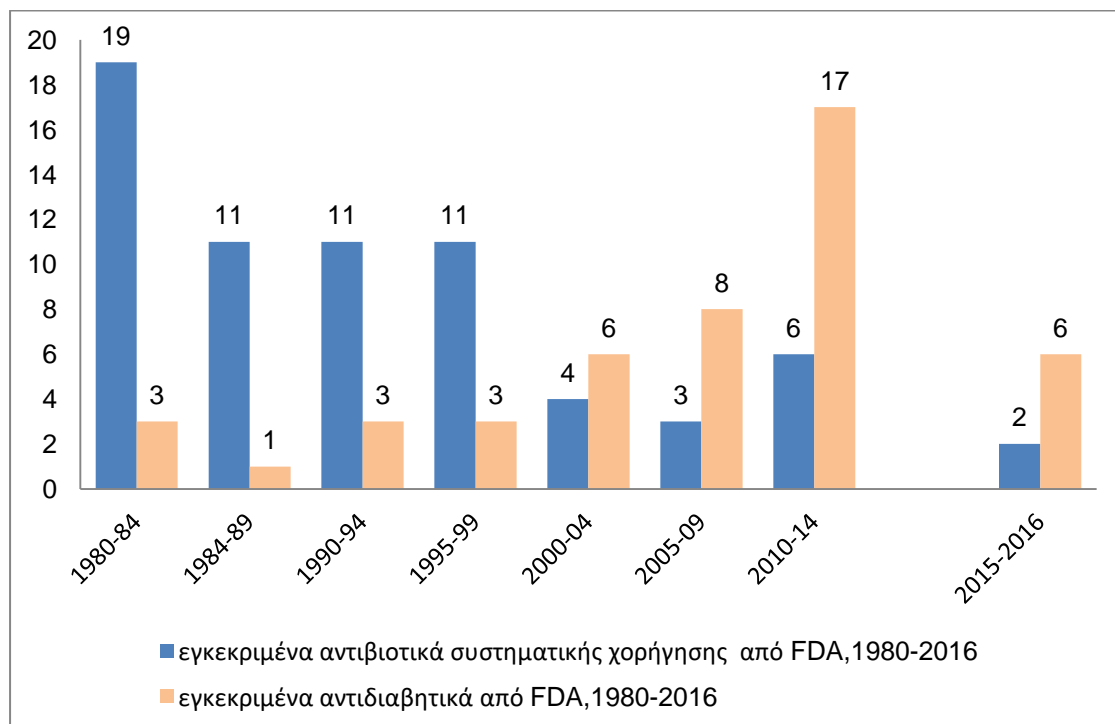
εικόνα 16: ο αριθμός των φαρμακευτικών εταιρειών που παραμένουν στον τομέα των αντιβιοτικών

Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι να μην θεωρείται επικερδής επένδυση η ανακάλυψη κι η ανάπτυξη αντιβιοτικών . Η Καθαρή Παρούσα Αξία (Net Present Value, NPV) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που χρησιμοποιείται στην οικονομική επιστήμη και στα χρηματοοικονομικά για να καθοριστεί αν μια επένδυση κρίνεται συμφέρουσα για να χρηματοδοτηθεί ή όχι. Όσο περισσότερο θετική είναι η τιμή NPV , τόσο περισσότερο κερδοφόρα είναι η επένδυση, ενώ αρνητικές τιμές υποδηλώνουν ότι η επένδυση καταλήγει σε ζημία. Για παράδειγμα ,η NPV για ένα αντικαταθλιπτικό φάρμακο υπολογίζεται ότι είναι θετική 720 εκατ. δολάρια και η NPV φάρμακου για αρθρίτιδα εκτιμάται θετική 1 δισ. δολάρια. Η NPV για ένα ενέσιμο αντιβιοτικό εναντίον Gram θετικών βακτηρίων είναι θετική 100 εκατ. δολάρια [84,85]. Μέχρι το 1962 οι επιστήμονες είχαν ανακαλύψει περισσότερες από 20 τάξεις αντιβιοτικών. Από το 1962 ως το 1987 ανακάλυψαν άλλες 2 νέες τάξεις. Από το 1987 ως το 2014 δεν ανακαλύφθηκε κανένα αντιβακτηριακό φάρμακο με νέο μηχανισμό δράσης. Το 2015 ανακοινώθηκε η ανακάλυψη ενός καινούργιου αντιβιοτικού, η teixobactin ,με μηχανισμό που παρεμποδίζει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Πρόκειται για αντιβιοτικό εναντίον θετικών κατά Gram βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των MRSA, VRE, *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile* [81]. Τα τελευταία χρόνια οι ανακαλύψεις και οι εγκρίσεις φαρμάκων αφορούν σε λοιμώξεις από θετικά κατά Gram βακτήρια αφήνοντας την ανθρωπότητα και τα επιτεύγματα της σύγχρονης ιατρικής εκτεθειμένα στον κίνδυνο της αυξανόμενης συχνότητας των ανθεκτικών λοιμώξεων από Gram-αρνητικά βακτήρια (Gram Negative Bacteria,GNB). Δεν έχει ανακαλυφθεί κανένας νέος παράγοντας εναντίον των GNB από την εποχή του ναλιδιξικού οξέος, πρόγονος των μετέπειτα συνθετικών κινολονών, εδώ και 50 χρόνια περίπου (εικόνα 17) [4,5,19].



εικόνα 17: χρονολογική σειρά της ανακάλυψης των διαφόρων τάξεων των αντιβακτηριακών.

Από τη μία το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής εντείνεται ,από την άλλη τα τελευταία 30 χρόνια μειώθηκε κατά 90% ο αριθμός των αντιβιοτικών συστηματικής χορήγησης που πήραν έγκριση από το FDA. Στο σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), αντιθέτως, αυξήθηκε ο αριθμός των εγκεκριμένων φαρμάκων, ιδιαιτέρως την τελευταία δεκαετία (εικόνα 18) [86].



εικόνα 18:ο αριθμός των εγκεκριμένων από το FDA φαρμάκων για τις βακτηριακές λοιμώξεις και το ΣΔ το διάστημα 1980-2016.

1.5 Διεθνής κινητοποίηση για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής. Εθνικά και Διεθνή Σχέδια Δράσης, Εθνικό σχέδιο δράσης «Προκρούστης»

Η διασπορά των πολυανθεκτικών (MDR και XDR) και πανανθεκτικών βακτηρίων (PDR) κρούει τον κώδωνα τον κινδύνου και δεν αφήνει άλλα περιθώρια για περαιτέρω αναμονή και απραξία. Το μέγεθος της απειλής απασχολούσε έντονα τόσο την ιατρική κοινότητα όσο και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) ,την IDSA (Infectious Diseases Society of America) και το HPA (Health Protection Agency) του Ηνωμένου Βασιλείου από τέλη του 1990, ιδιαίτερα μετά την περιγραφή των πρώτων ανθεκτικών στελεχών στα τελευταία διαθέσιμα αντιβιοτικά, ανησυχία που

εκφραζόταν με αδιάλειπτη αρθρογραφία, προσπάθειες ευαισθητοποίησης ,την εφαρμογή σχεδίων δράσης και με την άσκηση πίεσης σε κυβερνητικά όργανα και φορείς πολιτικής εξουσίας [87,88,89].

Το 2014 αποτελεί μια χρονιά –σταθμός . Τόσο ο Π.Ο.Υ. όσο και το Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) δημοσίευσαν σημαντικές αναλύσεις για τα αίτια και το μέγεθος του προβλήματος και τις επιπτώσεις του στη δημόσια υγεία και στην οικονομία [8,19]. Αυτές οι 2 αναλύσεις έθεσαν τις βάσεις για την ενίσχυση της διεθνούς κινητοποίησης σε επιστημονικό και πολιτικό επίπεδο.

Διεθνής κοινότητα: Το Δεκέμβριο του 2014 διαμορφώθηκε από τον Π.Ο.Υ. το πρώτο Παγκόσμιο Σχέδιο Δράσης για την Αντιμετώπιση της Μικροβιακής Αντοχής, το «Global Action Plan on Antimicrobial Resistance» ,με τη συμβολή επιστημόνων από 100 κράτη, συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδος. Η αποτελεσματική υλοποίησή του προϋποθέτει τη δέσμευση των κρατών σε ανώτερο πολιτικό επίπεδο [90].

Την περίοδο εκείνη, πολλά κράτη, αναγνωρίζοντας τη σοβαρότητα του προβλήματος, δρομολόγησαν Εθνικές Στρατηγικές Αντιμετώπισης της Μικροβιακής Αντοχής . Για παράδειγμα, κήρυξαν τη θέσπιση πενταετών εθνικών σχεδίων ο Λευκός Οίκος (National Action Plan for Combating Antibiotic-resistant Bacteria 2015-2019), η Αυστραλία (National Antimicrobial Resistance Strategy 2015-2019) ,ο Καναδάς (Federal Action Plan on Antimicrobial Resistance and Use in Canada 2015-2019), αρκετές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και πολύ προσφάτως , το Σεπτέμβριο του 2016, η Κίνα (National Action Plan to Contain Antimicrobial Resistance 2016-2020), ενώ στην Ινδία , μία από τις χώρες όπου το πρόβλημα είναι οξύτατο , γίνονται βήματα προς αυτήν την κατεύθυνση μετά την υπογραφή της Διακήρυξης του Τσενάι (Chennai Declaration: 5-year plan to tackle the challenge of anti-microbial resistance) [91-95,100].

Η Διατλαντική Ειδική Ομάδα για τη Μικροβιακή Αντοχή (Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance, TATFAR) δημιουργήθηκε το 2009 με στόχο τη βελτίωση της συνεργασίας μεταξύ των ΗΠΑ και της ΕΕ στην αντιμετώπιση του προβλήματος. Τον Οκτώβριο του 2015 η συνεργασία ανανεώθηκε για ακόμη 5 χρόνια (2016-2020) και σε αυτήν εντάχθηκαν επίσης ο Καναδάς και η Νορβηγία.

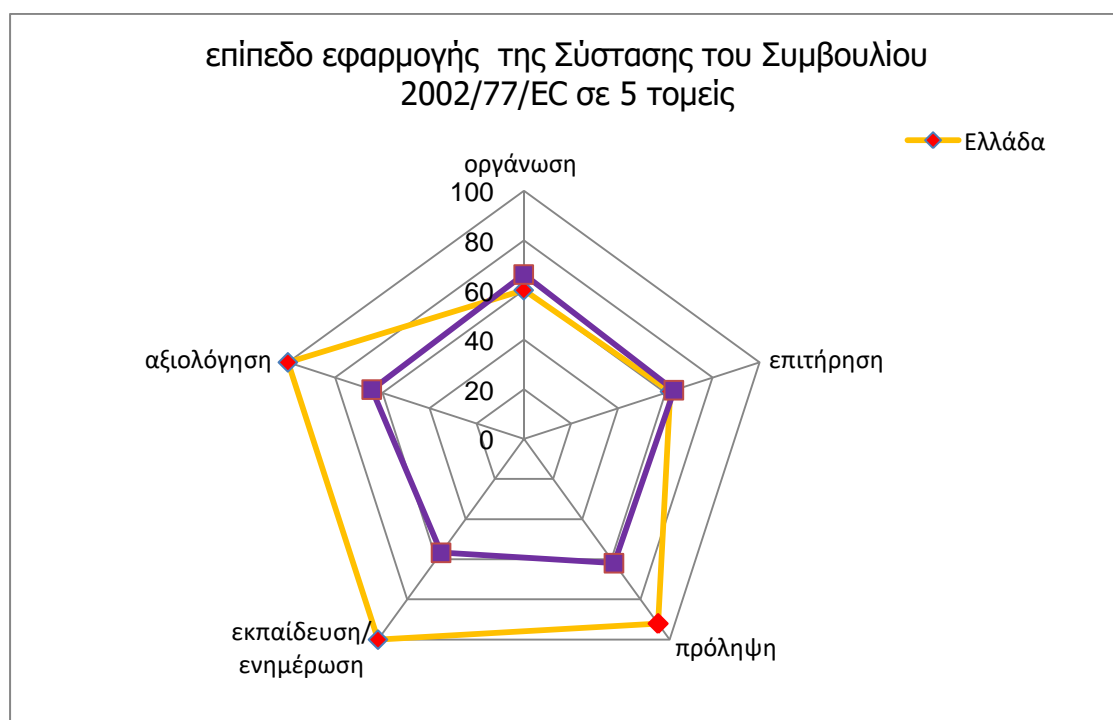
Ευρώπη: Το 2011 διαμορφώθηκε από το Ευρωκοινοβούλιο ένα Σχέδιο 12 Δράσεων κατά των αυξανόμενων κινδύνων από τη Μικροβιακή Αντοχή (Action Plan against the rising threats from AMR) στο πλαίσιο της ενιαίας πολιτικής υγείας «One Health Approach» [98] . Το 2016 , σε έρευνα στην οποία συμμετείχαν τα 29 από τα 31 κράτη-μέλη του Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (European Economic Area, EEA), έδειξε ότι 21 μέλη έχουν Εθνικά Σχέδια Δράσης (21/29) για το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής και 2 βρίσκονταν στο στάδιο της προετοιμασίας. Τα σχέδια δράσης είχαν δρομολογηθεί ή αναθεωρηθεί τα τελευταία 2 χρόνια σε 12 χώρες (12/21).Και στις 21 χώρες τα εν λόγω σχέδια δράσης περιλαμβάνουν μέτρα σχετικά με την επιτήρηση, τη συνετή χρήση των αντιμικροβιακών ,την ενημέρωση και την εκπαίδευση(21/21). Μέτρα για την ανίχνευση και τον έλεγχο των επιδημικών εκρήξεων υπάρχουν σε 16 από τα 21 σχέδια (16/21) , μέτρα για την έρευνα σε 14 σχέδια (14 /21) και για τη χρήση των ταχέων διαγνωστικών δοκιμασιών σε 9 (9/21). Γηροκομεία και Ιδρύματα Μακροχρόνιας Περίθαλψης (Long Term Care Facility, LTCFs) καλύφθηκαν από 14 σχέδια δράσης (14/21) . Και οι 29 χώρες συμμετέχουν σε ευρωπαϊκά δίκτυα επιτήρησης (29/29), όπως το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Μικροβιακής Αντοχής (EARS-Net), το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Κατανάλωσης Αντιβιοτικών (ESAC-Net) και το Δίκτυο Επιτήρησης των σχετιζόμενων με μονάδες υγείας λοιμώξεων (HAI-Net). Σε 26 χώρες από τις 29 ,υπάρχουν επιπρόσθετα εθνικά συστήματα επιτήρησης που παρέχουν πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων της επιτήρησης των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακών (26/29) και της επιτήρησης των εντεροβακτηριακών που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (24/29) [99].

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) εκφράζει αυτή την πολιτική της Ε.Ε. με τις δράσεις που υλοποιεί, έχει ήδη συμπεριλάβει την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής στον 5ετή προγραμματισμό του και έχει αφιερώσει μεγάλο ποσοστό του προϋπολογισμού του. Έχει ,επίσης, θεσπίσει την Ευρωπαϊκή Ημέρα για την Ορθολογική Χρήση των Αντιβιοτικών (European Antibiotic Awareness Day - EAAD) στις 18 Νοεμβρίου κάθε έτους . Ο θεσμός αυτός ξεκίνησε το 2008 και αφιερώνεται στην ευαισθητοποίηση τόσο των επαγγελματιών υγείας όσο και των πολιτών [96].

Ελλάδα: Η Ελλάδα συμμετέχει ενεργά σε όλες τις παραπάνω διεθνείς και ευρωπαϊκές δράσεις. Σε επίπεδο εθνικής πολιτικής, η πρώτη προσπάθεια έγινε το 2008 με το «Εθνικό Σχέδιο Δράσης για την Αντιμετώπιση της Μικροβιακής Αντοχής στα Αντιβιοτικά και των Λοιμώξεων σε Χώρους Παροχής Υπηρεσιών Υγείας 2008-2012». Υπεύθυνος φορέας για την επιδημιολογική επιτήρηση είναι το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (πρώην Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων). Αναγνωρίζοντας την επιτακτική ανάγκη για λήψη μέτρων περιορισμού της αντοχής, το ΚΕΕΛΠΝΟ συγκρότησε το Νοέμβριο του 2010 το εθνικό σχέδιο δράσης « Προκρούστης» για την επιτήρηση λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά παθογόνα σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας [101]. Το 2014 το εν λόγω σχέδιο μετασηματίστηκε και επεκτάθηκε κατόπιν σχετικής υπουργικής απόφασης. Τώρα βρίσκεται στην τρίτη περίοδο του (έναρξη Ιούλιος 2014) [102].

Σύμφωνα με την έρευνα που έγινε στις 29 χώρες EU/EAA, στην Ελλάδα το επίπεδο εφαρμογής των βασικών μέτρων σε 5 τομείς που ορίζει η Σύσταση του Συμβουλίου 2002/77/EC για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής βρίσκεται κοντά στο μέσο όρο των 29 χωρών όσον αφορά στους τομείς της οργάνωσης και της επιτήρησης και ανώτερο του μέσου όρου όσον αφορά στους τομείς της πρόληψης, της ενημέρωσης –εκπαίδευσης και της αξιολόγησης (εικόνα 19). Ενδεικτικά στη συνέχεια αναφέρονται κάποια από τα βασικά σημεία που διερευνήθηκαν ώστε να εκτιμηθεί το επίπεδο της εφαρμογής της Σύστασης του Συμβουλίου (i) στον τομέα της οργάνωσης (Organisation and governance), αν υπάρχουν πχ εθνικό σχέδιο δράσης και το αν αυτό επεκτείνεται σε γηροκομεία και LTCFs, Διατομεακός Συντονιστικός Μηχανισμός ή ισοδύναμο σύστημα, ειδικός προϋπολογισμός για την υλοποίηση του σχεδίου κοκ (ii) στον τομέα της επιτήρησης (Surveillance), αν υπάρχουν συστήματα συναγερμού για πολυανθεκτικά μικρόβια και έγκαιρης ειδοποίησης των υγειονομικών αρχών, σύστημα επιτήρησης των λοιμώξεων και της χρήσης αντιβιοτικών σε γηροκομεία και LTCFs, ετήσια Εθνική Έκθεση Μικροβιακής Αντοχής, σύστημα καταγραφής και δυνατότητα πρόσβασης σε δεδομένα της κατανάλωσης αντιβιοτικών και της συνταγογράφησης κα (iii) στον τομέα της πρόληψης (Prevention), αν το ποσοστό των αντιβιοτικών συστηματικής χρήσης που πωλούνται χωρίς συνταγή στα φαρμακεία είναι <1%, αν υπάρχουν εθνικές

κατευθυντήριες γραμμές για την πρόληψη και τον έλεγχο των νοσοκομειακών ή/και ανθεκτικών λοιμώξεων ,αν η κυβέρνηση ενθαρρύνει τη χρήση ταχέων διαγνωστικών μεθόδων (Rapid Diagnostic Tests,RDTs), αν υπάρχει σύστημα ηλεκτρονικής συνταγογράφησης αντιβιοτικών εντός και εκτός νοσοκομείου, αν υπάρχουν όσον αφορά στα στελέχη CRE κατευθυντήριες γραμμές για τον εντοπισμό και τη διαλογή ασθενών με αυξημένη πιθανότητα αποικισμού κα (iv) στον τομέα της εκπαίδευσης και ενημέρωσης (Information/Education) ,αν υπάρχει σύστημα παροχής υποχρεωτικής εκπαίδευσης σε όλο το προσωπικό υγειονομικής περίθαλψης κατά την έναρξη της υπηρεσίας του, εθνική εκστρατεία για τη μικροβιακή αντοχή και ειδικά εκπαιδευτικά προγράμματα (v) στον τομέα της αξιολόγησης (Evaluation) , αν υπάρχουν δείκτες για την αξιολόγηση της εφαρμογής του εθνικού σχεδίου και των αποτελεσμάτων του, δείκτες για αξιολόγηση της μικροβιακής αντοχής και της χρήσης των αντιμικροβιακών παραγόντων, δείκτες για την αξιολόγηση των μέτρων ελέγχου και πρόληψης , αξιολόγηση της συμμόρφωσης του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού με τις κατευθυντήριες γραμμές για την υγιεινή των χεριών , αξιολόγηση της επίδρασης των εφαρμοζόμενων μέτρων ελέγχου λοιμώξεων στη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων λοιμώξεων στα νοσοκομεία [99].



εικόνα 19: διάγραμμα ραντάρ που προέκυψε από την επεξεργασία των δεδομένων που παρουσιάζονται στην έκθεση του 2016 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (βλ. κείμενο)

Στην κινητοποίηση συμμετέχουν ενεργά ανεξάρτητες επιστημονικές οργανώσεις, όπως ReAct, WAAAR, CDDEP, GARP. Η ReAct ιδρύθηκε επίσημα το 2005 με στόχο την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής από μια ολιστική θεώρηση (<http://www.reactgroup.org>). Η World Alliance Against Antimicrobial Resistance (WAAAR) προσπαθεί να ευαισθητοποιήσει την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, αλλά και τις πολιτικές ηγεσίες στην αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής (<http://www.waaar.org/>). Το Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP) παράγει ανεξάρτητη, διεπιστημονική έρευνα για να προωθήσει την υγεία και την ευημερία των ανθρώπινων πληθυσμών στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε όλο τον κόσμο (<http://www.cddep.org>). Η Global Antibiotic Resistance Partnership (GARP) ιδρύθηκε το 2008 με χρηματοδότηση από το ίδρυμα Bill & Melinda Gates. Ο στόχος της είναι η προώθηση της πολιτικής συνετής χρήσης αντιβιοτικών και η αντιμετώπιση της αντοχής στις χαμηλού-μεσαίου εισοδήματος χώρες (<http://www.cddep.org/garp/home>). Στις 21 Ιανουαρίου 2016, στο Παγκόσμιο Οικονομικό Φόρουμ (World Economic Forum, WEF), στο Νταβός της Ελβετίας, συντάχθηκε η «Διακήρυξη Καταπολέμησης της Μικροβιακής Αντοχής». Υπογράφηκε από 85 επιχειρήσεις και 9 φορείς της βιομηχανίας από τουλάχιστον 18 χώρες. Αποτελεί σημαντικό σταθμό στη διεθνή προσπάθεια αντιμετώπισης του προβλήματος της μικροβιακής αντοχής, καθώς για πρώτη φορά φαρμακευτικές βιομηχανίες δεσμεύονται σε ένα κοινό πλαίσιο αρχών για διεθνή δράση με στόχο τη διαφύλαξη της αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών και της ανάπτυξης νέων φαρμάκων, διαγνωστικών μεθόδων και εμβολίων. Τον Ιούλιο του 2016 ιδρύθηκε και η CARB-X, μια επιστημονική οργάνωση με συμμετοχή εθνικών κυβερνήσεων, που προωθεί τη χρηματοδότηση της έρευνας για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και διαγνωστικών τεχνικών. Στις 21 Σεπτεμβρίου 2016, οι ηγέτες των 193 κρατών - μελών του ΟΗΕ συναντήθηκαν στη Γενική Συνέλευση των Ηνωμένων Εθνών στη Νέα Υόρκη για να συμφωνήσουν και να δεσμευτούν σε μία βιώσιμη, διατομεακή προσέγγιση στην καταπολέμηση της μικροβιακής αντοχής. Επαναβεβαίωσαν τη δέσμευσή τους για δρομολόγηση εθνικών σχεδίων στο πρότυπο του Global Action Plan on Antimicrobial Resistance του Π.Ο.Υ. Αυτή ήταν μόλις η τέταρτη φορά στην ιστορία του ΟΗΕ που ένα θέμα υγείας συζητήθηκε κατά τη Γενική Συνέλευση (HIV, μη μεταδοτικές ασθένειες και ο ιός Έμπολα ήταν οι άλλοι τρεις) [103].

2. Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής

Τα μικρόβια κατοικούν στην κυριολεξία σε κάθε πιθανό περιβάλλον του πλανήτη. Υπάρχουν μικροοργανισμοί που διαβιούν σε ακραίες συνθήκες (ακρόφιλα βακτήρια, extremophiles): σε πολύ υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες (θερμόφιλα-υπερθερμόφιλα πχ στους θερμοπίδακες και ψυχρόφιλα-υπέρψυχρόφιλα στην Αρκτική και Ανταρκτική) , κάτω από εξαιρετικά υψηλές πιέσεις (βαρόφιλα πχ στα βάθη των ωκεανών), σε μέρη με απουσία νερού (ξηρόφιλα πχ σε ερήμους) ή με υψηλή αλατότητα (αλόφιλα- υπεραλόφιλα) ή με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων (ωσμόφιλα), σε όξινα και αλκαλικά περιβάλλοντα (οξεόφιλα πχ στους θερμοπίδακες και αλκαλόφιλα στις Soda lakes στην Αφρική και τις Δυτικές ΗΠΑ), βαθιά στο φλοιό της γης μέσα σε πετρώματα (λιθόφιλα), σε μέρη με μηδενική περιεκτικότητα σε οξυγόνο (αναερόβια) , παρουσία ή απουσία ηλιακού φωτός , παρουσία ιονίζουσας ακτινοβολίας κοκ [104]. Λόγω αυτής της εξαιρετικής προσαρμοστικότητάς τους στα διάφορα περιβάλλοντα, τα μικρόβια φθάνουν να αντιπροσωπεύουν το 60% της συνολικής βιομάζας του πλανήτη (αν εξαιρεθεί η κυτταρίνη από τον υπολογισμό, τότε συνιστούν το 90%) , παρά το πολύ μικρό μέγεθός τους [88,106].

Οι άνθρωποι θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως κινούμενοι μικροβιακοί πλανήτες. Πράγματι ,τα μικρόβια κατοικούν πάνω και μέσα σε κάθε ανθρώπινο ον, ιδιαίτερα στο δέρμα και τους βλεννογόνους και ο αριθμός τους είναι κατά 5 με 10 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων του σώματος μας [88, 105]. Η παρουσία τους στη γη υπολογίζεται σε 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια, ενώ ο ρυθμός αναπαραγωγής τους είναι ταχύς .Τα περισσότερα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε μόλις 20-30 λεπτά [107].

Συμπερασματικά, τα μικρόβια υπερτερούν του ανθρώπινου είδους αριθμητικά, κατά ένα συντελεστή 10^{22} , και σε μάζα κατά ένα συντελεστή 10^8 , υπάρχουν εδώ και 1000 φορές περισσότερα χρόνια από ό, τι το είδος μας και έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται μέχρι 500.000 γενιές κατά τη διάρκεια 1 δικής μας γενεάς. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι τα βακτήρια είναι το πιο πολυπληθές , πολυποίκιλο και προσαρμόσιμο είδος οργανισμών που έχει ποτέ ζήσει στον πλανήτη (πίνακας 1). [88, 105].

	Μικρόβια	Άνθρωποι	συντελεστής
αριθμός	5×10^{31}	7×10^9	10^{22}
Μάζα (σε τόνους)	5×10^{16}	3×10^8	10^8
Χρόνος γενεάς	30λεπτά	30 χρόνια	5×10^5
Διάρκεια παρουσίας στη γη	3,5 δισεκ	4 εκατ	10^3

πίνακας 1 : στοιχεία από [105]

Τα μικρόβια ανέπτυξαν την ικανότητα σύνθεσης ουσιών ικανών να θανατώνουν άλλα ανταγωνιστικά μικρόβια (τα αντι-βιοτικά) ,ενώ παράλληλα είχαν μηχανισμούς που τους παρείχαν τόσο αυτοπροστασία στα αντιβιοτικά που παρήγαγαν τα ίδια όσο και προστασία από τα βλαπτικά προϊόντα των ανταγωνιστικών τους μικροβίων. Σύμφωνα με γενετική ανάλυση μικροβιακών μεταβολικών οδών υπάρχουν ενδείξεις ότι τα βακτήρια επινόησαν και παρήγαγαν τόσο τα β-λακταμικά αντιβιοτικά όσο και τις β- λακταμάσες, 2 δισεκατομμύρια χρόνια πριν [108]. Προσφάτως, για πρώτη φορά βρέθηκαν φυσικές αποδείξεις της παρουσίας αρχαίων γονιδίων αντοχής, που χρονολογούνται 30000 χρόνια πριν, σε κομμάτια παγωμένου εδάφους από την Καναδική Αρκτική. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν αντοχή σε β- λακτάμες, τετρακυκλίνες και γλυκοπεπτίδια [116,117]. Επομένως, τα μικρόβια είχαν την εμπειρία τόσο της σύνθεσης των αντιβιοτικών όσο και της αδρανοποίησής τους πολύ πρωτότερα από τότε που ο Homo sapiens άρχισε να αντιλαμβάνεται την ύπαρξη των μικροβίων και να ανακαλύπτει τα αντιβιοτικά. Το φαινόμενο δηλαδή της μικροβιακής αντοχής είναι ένα φαινόμενο που προϋπάρχει του ανθρώπου. Όμως, η μεγάλη κατανάλωση των αντιμικροβιακών από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα άσκησε έντονη πίεση επιλογής και επιτάχυνε το ρυθμό του φαινομένου.

2.1 συγγενής και επίκτητη μικροβιακή αντοχή

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι εγγενής (intrinsic) ή επίκτητη (acquired). **Εγγενής αντοχή:** είναι χαρακτηριστική του είδους ή του γένους του μικροβίου (wild strain). Αφορά μικρόβια που ουδέποτε υπήρξαν ευαίσθητα στο συγκεκριμένο φάρμακο. Για παράδειγμα, τα εντεροβακτηριακά έχουν εγγενή αντοχή σε πενικιλίνη G, γλυκοπεπτίδια ,φουσιδικό οξύ, δαπτομυκίνη, λινεζολίδη, καποιες

μακρολίδες, λινκοζαμίνες, ριφαμπικίνη [109]. Η γνώση της εγγενούς αντίστασης ενός μικροβίου είναι σημαντική στην κλινική πράξη για την αποφυγή χορήγησης ακατάλληλης και αναποτελεσματικής αγωγής.

Table 1. Intrinsic resistance in Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae are also intrinsically resistant to benzylpenicillin, glycopeptides (with some exceptions¹), lincosamides, streptogramins, rifampicin, daptomycin and linezolid.

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Amoxicillin-Clavulanic acid	Ampicillin-sulbactam	Ticarcillin	Cefazolin, Cefalotin, Cefalexin, Cefadroxil	Cefoxitin ²	Cefuroxime	Tetracyclines	Tigecycline	Polymyxin B, Colistin	Nitrofurantoin
1.1	<i>Citrobacter koseri</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> ³	R			R							
1.2	<i>Citrobacter freundii</i> ⁴	R	R	R		R	R					
1.3	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	R	R	R		R	R					
1.4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R	R		R	R					
1.5	<i>Escherichia hermannii</i>	R			R							
1.6	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R		R	R					
1.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R			R							
1.8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R			R							
1.9	<i>Morganella morganii</i>	R	R	R		R			R		R	R
1.10	<i>Proteus mirabilis</i>								R	R	R	R
1.11	<i>Proteus penneri</i>	R				R		R	R	R	R	R
1.12	<i>Proteus vulgaris</i>	R				R		R	R	R	R	R
1.13	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R	R		R		R	R	R	R	R
1.14	<i>Providencia stuartii</i>	R	R	R		R		R	R	R	R	R
1.15	<i>Raoultella</i> spp.	R			R							
1.16	<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R		R	R	R	R ⁵		R	R
1.17	<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R					
1.18	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>										R	

R = resistant

¹ Azithromycin is effective *in vivo* for the treatment of typhoid fever and erythromycin may be used to treat travellers' diarrhoea.

Επίκτητη αντοχή: συμβαίνει όταν ένα μικρόβιο αποκτά την ικανότητα να αντισταθεί στην δραστικότητα ενός συγκεκριμένου αντιμικροβιακού στο οποίο ήταν προηγουμένως ευαίσθητο. Αυτό μπορεί να προκύψει από μετάλλαξη στο χρωμοσωματικό DNA ή από την απόκτηση εξωγενών γονιδίων αντοχής ή με συνδυασμό των δύο αυτών μηχανισμών. Σε αντίθεση με την εγγενή αντοχή, τα χαρακτηριστικά που συνδέονται με την επίκτητη αντοχή βρίσκονται μόνο σε ορισμένα στελέχη ή σε υποπληθυσμούς και δεν αφορούν καθολικά τα στελέχη του είδους ή του γένους. Η επίκτητη αντοχή αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα προσαρμογής των βακτηρίων στο μεταβαλλόμενο οικοσύστημα.

2.2 Αντοχή σε επίπεδο κοινότητας και σε κυτταρικό επίπεδο

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί καλύτερη κατανόηση των διεργασιών που διέπουν τη βακτηριακή οικολογία. Η έρευνα είχε ιστορικά εστιάσει στην κατανόηση των ενδοκυττάρων μηχανισμών αντοχής μελετώντας *in vitro* βακτήρια από πλαγκτονικές καλλιέργειες και αποικίες σε άγαρ και γι' αυτό η συνεισφορά της κοινότητας στο φαινόμενο της αντοχής έχει σε μεγάλο βαθμό αγνοηθεί. Όμως, τα περισσότερα βακτήρια δεν λειτουργούν σαν απομονωμένα κύτταρα. Στο βακτηριακό οικολογικό περιβάλλον παρατηρούνται πολλές αλληλεπιδράσεις (cell to cell interactions) και διακυτταρικές μεταδόσεις σημάτων (cell to cell signalling) που συμβάλλουν όχι μόνο στην εμφάνιση αλλά και στην ενίσχυση της συλλογικής αντοχής σε επίπεδο πια κοινότητας [118,119,120].

2.2.1 Αντοχή σε κυτταρικό επίπεδο

Οι κύριοι κυτταρικοί μηχανισμοί που συντελούν στην εμφάνιση μικροβιακής αντοχής είναι: (i) η μετατροπή του στόχου δράσης (ii) η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού με υδρόλυση ή τροποποίηση της δομής του (iii) μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα (iv) απομάκρυνση του φαρμάκου με αντλίες εκροής.

(i) μετατροπή του στόχου δράσης

Η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το μόριο-στόχο είναι ειδική και μικρές τροποποιήσεις του στόχου δράσης είναι ικανές να προκαλέσουν κλινικά σημαντική αντοχή. Παραδείγματα αυτού του μηχανισμού είναι:

α) οι τροποποιημένες πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins, PBPs) λόγω μεταλλάξεων στα ενδογενή γονίδια που τις κωδικοποιούν ή της απόκτησης ξένων γονιδίων που κωδικοποιούν νέες διαφορετικές PBPs (πχ η PBP2a στον MRSA που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mecA* ή από το πρόσφατα ανακαλυφθέν *mecC*, τα οποία αποκτήθηκαν μέσω της οριζόντιας μεταφοράς. Το γενετικό στοιχείο *mec* δεν είναι παρόν στο MSSA). Ο μηχανισμός αυτός αντοχής είναι συχνότερος στα θετικά κατά Gram βακτήρια [120,121,122,123].

β) τα αλλαγμένα πενταπεπτίδια στην πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Τα πενταπεπτίδια αυτά έχουν διαφορετικά ουραία άκρα (D-Ala-D-lactate ή D-Ala-

D- ser αντί του D- Ala-D- Ala). Αυτή η αντικατάσταση ελαττώνει τη συγγένεια των γλυκοπεπτιδίων στο στόχο. Η αλλαγή αυτή κωδικοποιείται στον VRE (Vancomycin Resistant Enterococcus) από τα πλασμιδιακά γονίδια *vanA* και *vanB*. Άλλα γονίδια αντοχής *van* είναι από -C ως και -N. Στον ανθεκτικό στα γλυκοπεπτίδια χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (GRSA) μεταφέρθηκε το γονίδιο *vanA* [137].

γ) η μεταλλαγμένη DNA-γυράση (μεταλλάξεις στα χρωμοσωματικά γονίδια *gyrA* ή *gyrB*) και η μεταλλαγμένη τοποϊσομεράση IV (μεταλλάξεις στα χρωμοσωματικά γονίδια *parC* ή *parE*), που προσδίδουν αντοχή στις φθοριοκινολόνες [124,125].

δ) το τροποποιημένο ριβόσωμα που προσδίδει αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (σημειακές μεταλλάξεις στα χρωμοσωματικά γονίδια *rpsL /strA*, *rpsD /ramA*, *rpsE /eps*, *strC / strB*) [126,127].

ε) η τροποποίηση της θέσης δέσμησης στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος λόγω μεθυλίωσης του 16S rRNA (ribosomal RNA, rRNA) από τις Arm/Rmt μεθυλοτρανσφεράσες, που προσδίδει αντοχή στις αμινογλυκοσίδες [126,127].

στ) το μεταλλαγμένο 23SrRNA στην 50S υπομονάδα του ριβοσώματος (σημειακές μεταλλάξεις) ή/και η τροποποίηση του 23SrRNA λόγω μεθυλίωσης σε κατάλοιπο αδενίνης που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες [128].

ζ) η μεταλλαγμένη RNA πολυμεράση (RNAP), που προσδίδει αντοχή στη ριφαμπικίνη (μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB*) [129].

η) η τροποποίηση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της κυτταρικής μεμβράνης, στόχος δράσης των πολυμικινών, με προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης στο λιπίδιο A, λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων *pmrA* και *pmrB* σε συνδυασμό με υπερέκφραση του ρυθμιστικού συστήματος *PmrCAB*, προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη. Το πρόσφατα ανακαλυφθέν πλασμιδιακό γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη *mrc-1* οδηγεί στην τροποποίηση LPS με τον ίδιο μηχανισμό. Δεύτερος μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη που εντοπίστηκε σε στελέχη *Acinetobacter* είναι η πλήρης απώλεια της παραγωγής του λιποπολυσακχαρίτη, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα γονίδια *lpxA*, *lpxC* και *lpxD* που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του λιπιδίου A [48,130,131].

θ) η αντίσταση στη λινεζολίδα είναι ακόμη σπάνια μεταξύ των σταφυλοκόκκων, όμως έχουν γίνει κάποιες αναφορές και σχετίζονται με αλλαγές στο rRNA (χρωμοσωμιακές μεταλλάξεις) και με τροποποίηση του 23S rRNA με μεθυλίωση από Crf μεθυλοτρανσφεράση [137,141].

θ) Η DNA-γυράση και η τοποϊσομεράση IV, στόχοι των φθοριοκινολονών, προστατεύονται από τη δράση του φαρμάκου συνδεόμενες στις pentapeptide repeat proteins (PRPs), πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα πλασμιδιακά μεταφερόμενα γονίδια της ομάδας *qnr* (*qnr A,-B,-C,-D,-S*) [124].

ι) Οι ριβοσωμικές προστατευτικές πρωτεΐνες (Ribosomal Protection Proteins, RPPs) προσδίδουν αντοχή στις τετρακυκλίνες συνδεόμενες στο ριβόσωμα και ελαττώνοντας τη συγγένεια του φαρμάκου στο στόχο [132].

(ii) η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού με υδρόλυση ή με τροποποίηση της δομής του

Τα βακτήρια παράγουν ένζυμα που είναι ικανά να μεταβάλλουν τη δομή του αντιβιοτικού καθιστώντας το αναποτελεσματικό. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι ενδογενή σε κάποια είδη, στις πιο πολλές περιπτώσεις όμως είναι επίκτητα. Παραδείγματα αυτού του μηχανισμού είναι :

α) οι β-λακταμάσες, υδρολυτικά ένζυμα, που διασπούν το β-λακταμικό δακτύλιο. Οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες είναι ενδογενείς σε όλα σχεδόν τα βακτήρια. Τα χρωμοσωμικά ένζυμα προϋπήρχαν της εποχής των αντιβιοτικών και θεωρείται ότι αναπτύχθηκαν για να προστατεύσουν τα βακτήρια από τα φυσικά β-λακταμικά παράγωγα μυκήτων και άλλων βακτηρίων. Το πρώτο βακτηριακό ένζυμο που αναφέρθηκε ότι αδρανοποιεί την πενικιλίνη, προτού ακόμη το φάρμακο εισέλθει στην κλινική πράξη, ήταν μία χρωμοσωμική AmpC β-λακταμάση σε *Escherichia coli*, παρόλο που δεν είχε ονομαστεί έτσι το 1940 [134]. Η πρώτη πλασμιδιακή β-λακταμάση, η TEM-1, ανακαλύφθηκε το 1965 στην Ελλάδα από την Κοντομιχάλου σε στέλεχος *E.coli* από ασθενή με λοίμωξη ουροποιητικού που δεν θεραπευόταν με αμπικιλίνη [135]. Σε κάποια γένη όπως *Enterobacter*, οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες είναι κάτω από ρυθμιστικό έλεγχο και η διατάραξη αυτών των μηχανισμών, πχ με την επίδραση του κλαβουλανικού οξέος, έχει ως αποτέλεσμα

την επαγωγή της δραστηριότητας τους με συνέπεια την εμφάνιση υψηλών επιπέδων αντοχής στα β-λακταμικά προϊόντα της θεραπείας .

β) οι αμινογλυκοσιδικές φωσφοτρανσφεράσες (APHs), οι νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες (ANTs) και οι ακετυλοτρανσφεράσες (AACs), που αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες. Η πλασμιδιακώς μεταφερόμενη αμινογλυκοσιδική ακετυλοτρανσφεράση *acc(6′)-Ib-cr* προσδίδει αντοχή και έναντι της σιπροφλοξασίνης και της νορφλοξασίνης [126].

γ) ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (CAT) [136].

δ) φλαβινοεξαρτώμενες μονοξυγενάσες που αδρανοποιούν τις τετρακυκλίνες [137].

(iii) μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα

Ένα αντιβιοτικό πρέπει να φτάσει στον στόχο του σε επαρκείς συγκεντρώσεις για να μπορέσει να ασκήσει τη δράση του. Προκειμένου να γίνει αυτό πρέπει να διασχίσει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και την εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη είναι χαρακτηριστικό των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Κάποια αντιβιοτικά μάλιστα έχουν σα στόχο δράσης τους το κυτταρικό τοίχωμα και την εξωτερική μεμβράνη όπως πχ οι β-λακτάμες, τα γλυκοπεπτίδια, οι πολυμυξίνες. Παραδείγματα αυτού του μηχανισμού είναι:

α) Η πάχυνση του βακτηριακού τοιχώματος λόγω υπερπαραγωγής των πενταπεπτιδίων. Παρατηρείται στον ενδιάμεση αντοχής στα γλυκοπεπτίδια χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο (GISA). Η αντοχή είναι ενδογενής (χρωμοσωμιακές μεταλλάξεις) [137,138].

β) Η ελάττωση των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης (Outer Membrane Proteins, OMPs), που λειτουργούν ως πορίνες. Υδρόφοβα αντιβιοτικά, όπως πχ οι β-λακτάμες και οι κινολόνες, μπορούν να περάσουν το λιπόφιλο φραγμό της εξωτερικής μεμβράνης μόνο μέσω αυτών των πορινών. Οι περισσότερες OMPs έχουν δομή β-βαρελίου, είναι διαμεμβρανικές και επιτρέπουν την είσοδο μορίων μικρότερων από 1500 kDa. Η απώλεια των πορινών προσδίδει φαινότυπους αντοχής. Για παράδειγμα, αντοχή εμφανίζουν στελέχη *E.coli* με απώλεια της πορίνης OmpC, ενώ στην *K.pneumoniae* η απώλεια των πορινών OmpK35 ή/και

OmpK36 οδηγεί σε αντοχή σε κεφαζολίνη, κεφαλοθίνη και κεφοξιτίνη και σε αυξημένες MIC για μεροπενέμη και κεφεπίμη. Σε κάποια είδη πχ στην *P.Aeruginosa* παρατηρείται εγγενής αντίσταση σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών οφειλόμενη κατά ένα μεγάλο μέρος στην παρουσία πορινών επιβραδυνόμενης διάχυσης. Η περιορισμένη είσοδος του αντιβιοτικού λόγω μείωσης στον αριθμό των πορινών ή/και λόγω βραδέος ρυθμού εισόδου συνήθως δεν αρκούν για την εμφάνιση υψηλών επιπέδων αντοχής. Για να συμβεί αυτό πρέπει να συνδυάζονται με την παραγωγή β- λακταμασών. [137,139,140].

(iv) απομάκρυνση του φαρμάκου με αντλίες εκροής

Τα συστήματα αντλιών εκροής εμπλέκονται στην εγγενή και στην επίκτητη αντοχή. Οι αντλίες είναι πρωτεϊνικά συμπλέγματα ,των οποίων ο ρόλος είναι η απομάκρυνση βλαπτικών ουσιών ,συμπεριλαμβανομένου του αντιβιοτικού, από το εσωτερικό του βακτηρίου. Κάποιες αντλίες είναι διμερή συμπλέγματα ,κάποιες άλλες είναι μονήρεις, όμως οι περισσότερες αντλίες ενεργητικής εκροής συνίστανται από 3 μείζονα τμήματα, τα οποία από τα έξω προς τα έσω είναι (εικόνα 20) :

α) η πρωτεΐνη-διάυλος της εξωτερικής μεμβράνης (Outer Membrane Protein,OMP)

β) η περιπλασματική συνδετική πρωτεΐνη

γ) ο πρωτεϊνικός μεταφορέας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Ταξινομούνται δομικά σε 5 υπεροικογένειες:

1) Small Multidrug Resistance –family (SMR)

2) Resistance-Nodulation-Division family (RND)

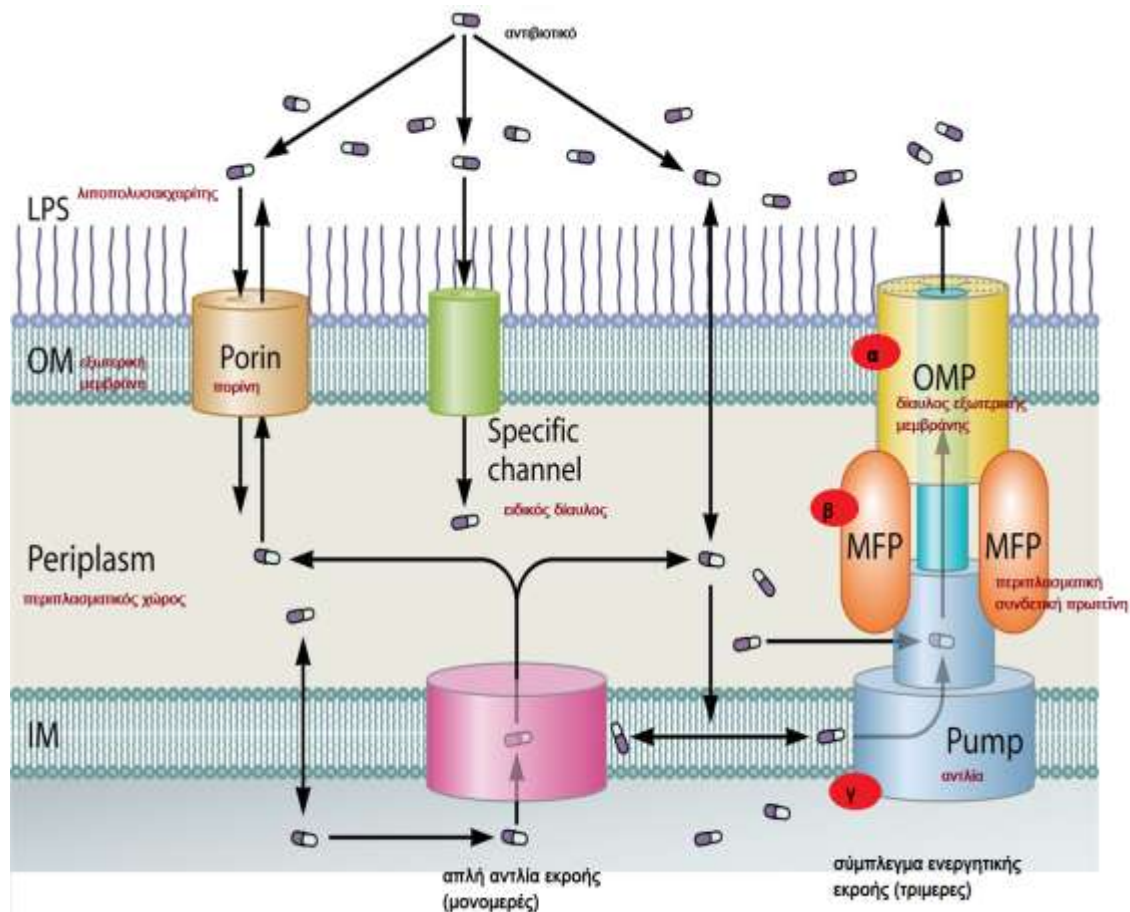
3) Major Facilitator Super-family (MFS)

4) ATP-Binding Cassette superfamily (ABC)

5) Multidrug and Toxic compound Extrusion family (MATE)

Με βάση την προέλευση της ενέργειας που καταναλίσκεται για τη λειτουργία τους διακρίνονται σε 2 κατηγορίες : α) σε αυτές που χρησιμοποιούν την ενέργεια από

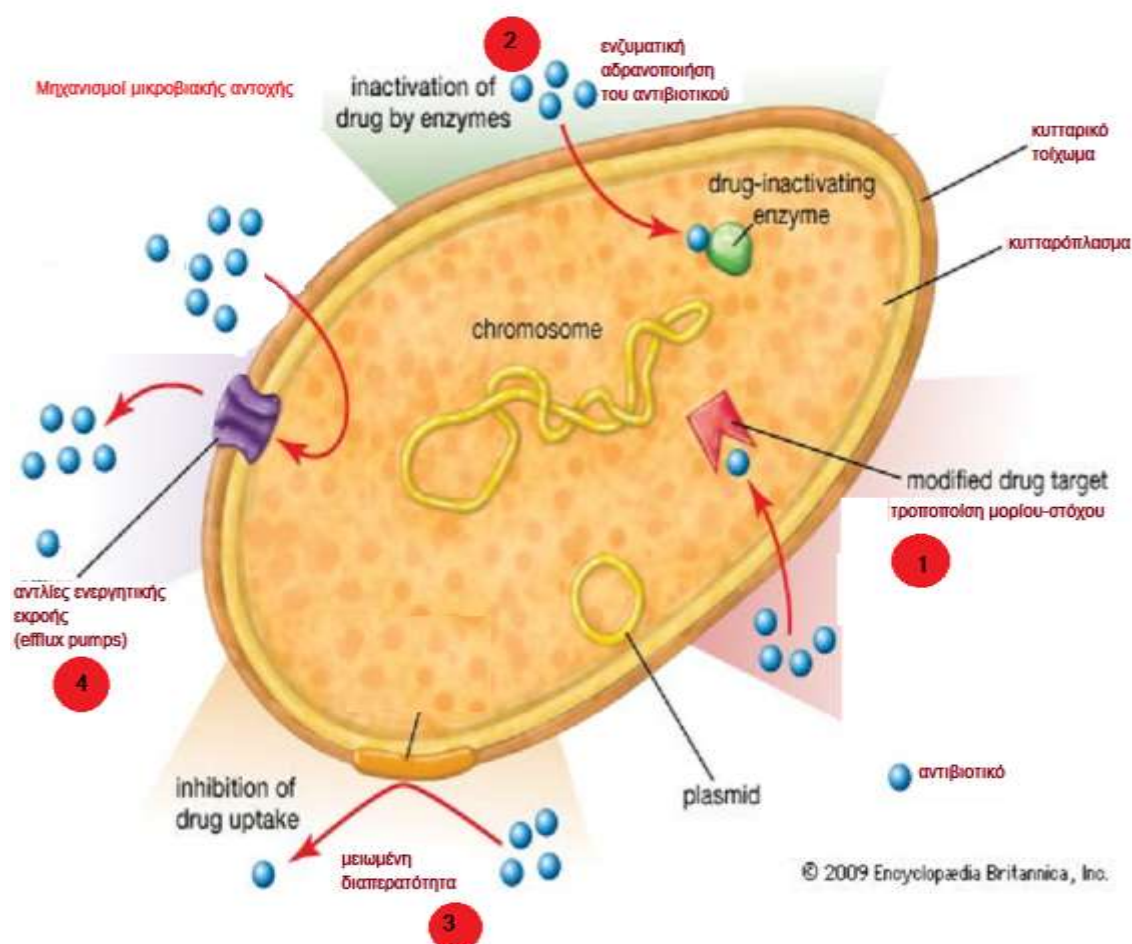
την υδρόλυση του ATP .Εδώ ανήκουν οι αντλίες της υπεροικογένειας ABC β) σε αυτές που χρησιμοποιούν την ενέργεια από την διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού κατά τη μεταφορά πρωτονίων. Εδώ υπάγονται οι υπόλοιπες 4 υπεροικογένειες.



εικόνα 20: το τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της αντλίας εκροής . Αποτελείται από α)διάυλο της εξωτερικής μεμβράνης β) περιπλασματική συνδετική πρωτεΐνη ή στην περίπτωση της οικογένειας RND πρόκειται για τη μεμβρανική πρωτεΐνη διάχυσης (*membrane fusion protein, MFP*) και γ) αντλία της εσωτερικής μεμβράνης. Προσαρμοσμένο σχήμα από [142]

Με εξαίρεση την υπεροικογένεια RND, που εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στα αρνητικά κατά gram βακτήρια, οι αντλίες των υπόλοιπων οικογενειών είναι ευρέως διαδεδομένες σε gram θετικά και gram αρνητικά. Τα γονίδια τους είναι αρχαίας προέλευσης και εντοπίζονται στα χρωμοσώματα. Όμως, τα τελευταία χρόνια γονίδια αντλιών εκροής ολοένα και συχνότερα εντοπίζονται σε πλασμίδια συνεπεία της εντεινόμενης πίεσης επιλογής από την αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών . Κάθε καινούργια αντλία και κάθε νέο γονίδιο καταγράφεται στις βάσεις

δεδομένων : www.membranetransport.org και Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org>). Πεδίο εντατικής έρευνας στη φαρμακευτική αποτελούν οι αναστολείς των αντλιών εκροής (efflux pump inhibitors) [142,143]. Κάποιες από τις καλύτερα μελετημένες αντλίες εκροής είναι : το σύστημα AcrAB/TolC , μέλος της υπεροικογένειας RND, που συναντάται ευρέως στα gram αρνητικά και προσδίδει αντοχή σε β-λακτάμες ,τετρακυκλίνες και σιπροφλοξασίνη [144]. Τέσσερα RND συστήματα (MexAB- OprM ,MexCD- OprJ, MexEF-OprN και MexXY-OprM) προσδίδουν κλινικά σημαντικά επίπεδα αντοχής σε *P.aeruginosa* σε αμινογλυκοσίδες, β-λακταμικά, σιπροφλοξασίνη, χλωραμφενικόλη [145]. Καινούργια συστήματα εκροής εμφανίστηκαν σε στελέχη *K.pneumoniae* (το KexD) και σε *S.mutans* (το MdeA) [146,147].



εικόνα 21: κυτταρικοί μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής : 1) τροποποίηση μορίου-στόχου πχ PBP's,DNA γυράση,LPS 2) αδρανοποίηση αντιβιοτικού πχ υδρόλυση από τις β-λακταμάσες 3) μειωμένη διαπερατότητα λόγω απώλειας ή τροποποίησης των πορινών 4) απομάκρυνση αντιβιοτικού με τις αντλίες ενεργητικής εκροής. Προσαρμοσμένο σχήμα.

2.2.2 Αντοχή σε επίπεδο κοινότητας (Community Level Resistance)

Βακτήρια οργανωμένα σε κοινότητα μπορούν να εκφράζουν μεγαλύτερη αντοχή σε καταστάσεις stress (πχ παρουσία αντιβιοτικού) , ενώ μεμονωμένα βακτήρια δεν μπορούν. Και αυτό καλείται συλλογική αντοχή ή αντοχή σε επίπεδο κοινότητας (Community Level Resistance) . Στο φυσικό περιβάλλον τους, οι μικροοργανισμοί ζουν στις βιομεμβράνες κατά το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους. Οι βιομεμβράνες (biofilm) συνιστούν αυτόνομες πολυπληθείς συναθροίσεις βακτηριακών κυττάρων . Αποτελούνται από την προσκολλητική επιφάνεια , τα βακτηριακά κύτταρα και το στρώμα από εξωκυττάριο πολυμερές (extracellular polymeric substances, EPSs) ή γλυκοκάλυκα, στο οποίο εμπεριέχονται πολυσακχαρίτες, ινίδια, πρωτεΐνες και εξωκυττάριο DNA (extracellular DNA, eDNA). Ο σχηματισμός των βιομεμβρανών είναι μια παλιά επιτυχημένη στρατηγική επιβίωσης των βακτηρίων. Το βιοφίλμ, συνεπώς, δεν αποτελεί απλά και τυχαία συνάθροιση μικροβιακών κυττάρων, αλλά έχει πολύπλοκη και τρισδιάστατη δομή και διέπεται από κύτταρο-κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και μεταδόσεις σημάτων. Τα βακτηριακά κύτταρα στις βιομεμβράνες διαμορφώνονται σε μικροαποικίες , οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους με διαύλους διαμέσου των οποίων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά και σηματοδοτικά μόρια και απομακρύνονται άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού. Η κατανομή των θρεπτικών συστατικών ή/και του οξυγόνου δεν είναι ομοιογενής. Βακτήρια που βρίσκονται στα βαθύτερα στρώματα έχουν βραδύτερο μεταβολισμό προσαρμοζόμενα στις τοπικές συνθήκες στέρσης θρεπτικών ουσιών. Υπάρχει , δηλαδή, στα βιοφίλμ ετερογένεια, γεγονός που εκφράζεται σε διαφορετικότητα στην έκφραση αντοχής μεταξύ των υποπληθυσμών. Τα βακτήρια ζουν σε βιομεμβράνες τόσο στο φυσικό περιβάλλον (πχ έδαφος , νερό) όσο και μέσα στον άνθρωπο (πχ οδοντική πλάκα). Το 80% των λοιμώξεων σχετίζεται με τον παθογενετικό μηχανισμό των βιομεμβρανών. Η ανάπτυξη της συλλογικής αντοχής εξηγείται με :

α) περιορισμένη διείσδυση των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Το εξωκυττάριο πολυμερές (EPS) λόγω της πυκνότητάς του, του ηλεκτροστατικού φορτίου του και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων επιβραδύνει τη ροή των αντιβιοτικών. Για παράδειγμα, οι αμινογλυκοσίδες είναι θετικά φορτισμένα μόρια και δεσμεύονται

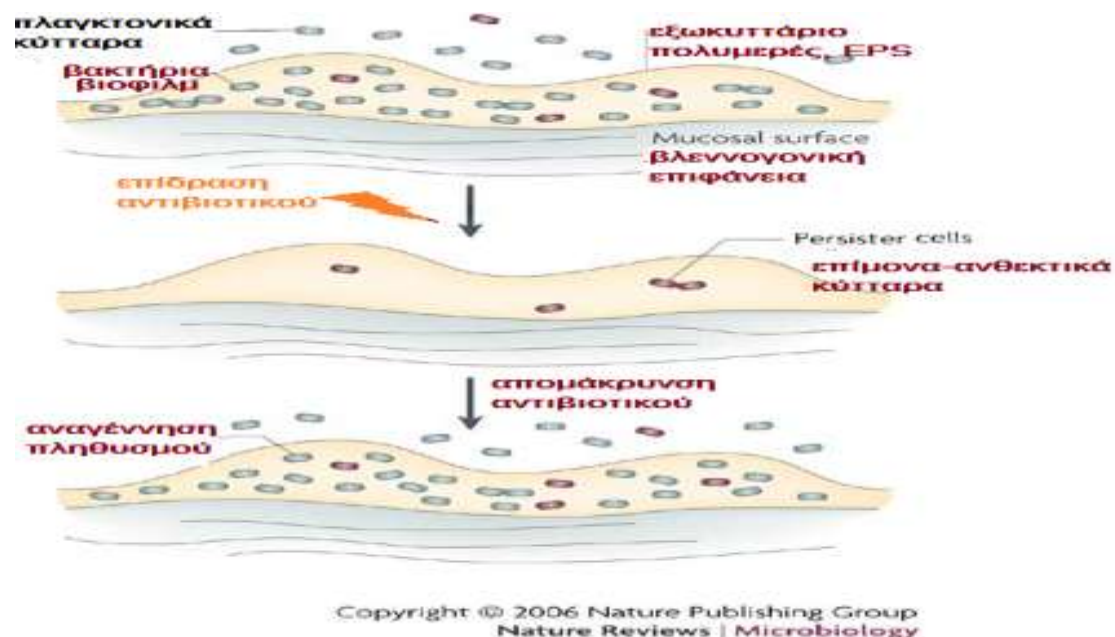
στα αρνητικά φορτισμένα μόρια του EPS. Όσο περισσότερο παχύ είναι ένα βιοφίλμ, τόσο περισσότερο καθυστερεί η διείσδυση του αντιβιοτικού. Επιπλέον, εντός του στρώματος περιέχονται υδρολυτικά ένζυμα που μπορούν να αδρανοποιήσουν το αντιβιοτικό. Το εξωκυττάριο πολυμερές, λοιπόν, αντιπροσωπεύει μία πρώτη γραμμή άμυνας [120,137,148].

β) στις βιομεμβράνες υπάρχει ετερογένεια στην κατανομή των θρεπτικών συστατικών. Στα σημεία όπου το μικροπεριβάλλον είναι στερητικό, τα βακτηριακά κύτταρα επιβραδύνουν το μεταβολισμό τους και πολλαπλασιάζονται βραδέως ή καθόλου και αυτό συντελεί στην εμφάνιση αντοχής έναντι των αντιβιοτικών εκείνων που θανατώνουν μόνο τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα βακτήρια, όπως πχ οι β-λακτάμες. Μόνο τα μεταβολικώς ενεργά βακτήρια θανατώνονται αποτελεσματικά από τα αντιμικροβιακά. Επίσης, η είσοδος στα κύτταρα ορισμένων αντιβιοτικών όπως οι αμινογλυκοσίδες είναι μια διαδικασία οξυγονοεξαρτώμενη. Επομένως, στις περιοχές του βιοφίλμ με συνθήκες υποξίας οι αμινογλυκοσίδες καθίστανται ανενεργές [137,148,149].

γ) υπάρχει αυξημένη προστασία έναντι εκείνων των παραγόντων του εξωτερικού περιβάλλοντος που θα μπορούσαν να δράσουν βλαπτικά στα βακτήρια, όπως η θερμοκρασία, το pH, το υπεριώδες φως, οι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή [148].

δ) ένα άλλο φαινόμενο που συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην εμφάνιση της αντοχής είναι η ανάδειξη των «επίμονων» ή των «ανθεκτικών κυττάρων» (persister cells). Τα κύτταρα αυτά είναι αδρανείς παραλλαγές των κανονικών βακτηριακών κυττάρων, που έχουν υιοθετήσει βραδύ ρυθμό λειτουργικής κατάστασης. Δεν είναι μεταλλαγμένα κύτταρα. Είναι ένας υποπληθυσμός των φυσιολογικών κυττάρων που εκφράζει φαινότυπο στασιμότητας. Πρόκειται για μία στρατηγική μεταβολικής ηρεμίας, που καθιστά αυτά τα βακτήρια ανεκτικά στη δράση των αντιβιοτικών, πιθανώς λόγω μεταγραφικού προγραμματισμού. Η απόκριση SOS (SOS response), ένα σύστημα ευρέως διαδεδομένο μεταξύ των βακτηρίων που προωθεί την κυτταρική επιβίωση μέσω της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, φαίνεται ότι μετέχει στην ανάδειξη αυτών των βακτηρίων με το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest). Ο υποπληθυσμός των επίμονων κυττάρων συνιστά

δεξαμενή επιζώντων κυττάρων, που είναι σε θέση να αναγεννηθούν και να προκαλέσουν τις υποτροπιάζουσες λοιμώξεις [150,151,152,164,192] (εικόνα 22) .



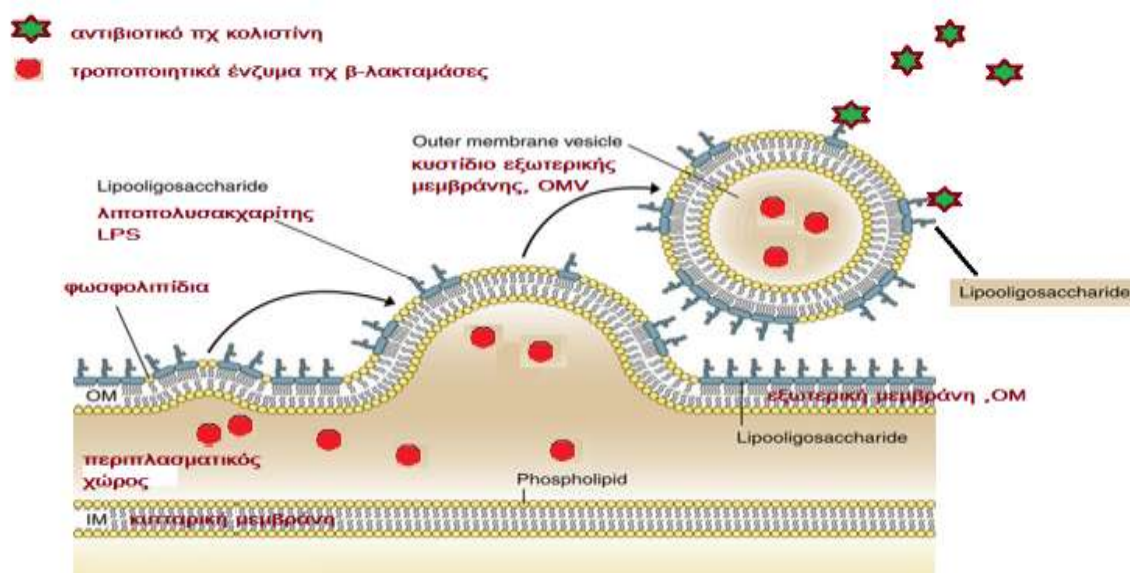
εικόνα 22: τα κύτταρα *persistor* αποτελούν δεξαμενή επιζώντων κυττάρων. Κατά την παρουσία του βλαπτικού παράγοντα επιβιώνουν γιατί εκφράζουν φαινότυπο βραδείας ανάπτυξης. Όταν απομακρυνθεί ο βλαπτικός παράγων είναι σε θέση να αναγεννηθούν. Σχήμα τροποποιημένο από [150]

ε) το εξωκυττάριο DNA (eDNA) υπάρχει σε αφθονία στις βιομεμβράνες ,είναι απαραίτητο για τη συγκρότηση του βιοφίλμ και συμβάλλει στην εμφάνιση της αντοχής . Επειδή είναι αρνητικά φορτισμένο συνδέεται με τα θετικά φορτισμένα αντιβιοτικά πχ τις αμινογλυκοσίδες εμποδίζοντας τη διείσδυσή τους [137,153,154].

στ) σύστημα απόκρισης στο στρες (stress response system) . Πρόκειται για ένα σύστημα που διαμορφώθηκε από τα βακτήρια για να διαχειρίζονται αποτελεσματικά επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Εκτός από το όφελος της επιβίωσης ,ευοδώνεται και η ανάπτυξη αντοχής. Σε απάντηση σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα τα βακτήρια επιστρατεύουν τους παράγοντες «σίγμα» εξωκυτταροπλασματικής δράσης (extra- cytoplasmatic function sigma factors, ECF), που δρουν σαν ρυθμιστές μεταγραφής. Με την επίδραση επιβλαβών ερεθισμάτων, όπως υποξία και συνθήκες στέρσης θρεπτικών συστατικών, ενισχύεται η μεταγραφή των προστατευτικών γονιδίων, που έχουν να κάνουν πχ με την καλύτερη δομική συγκρότηση του βιοφίλμ ή την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος . Τέτοιες συνθήκες στέρσης υπάρχουν στα εσωτερικά στρώματα του βιοφίλμ και η

ενεργοποίηση του συστήματος προάγει τόσο την επιβίωση των βακτηρίων όσο και την εμφάνιση της αντοχής σε ποικίλα αντιβιοτικά [137,155].

ζ) Τα τελευταία χρόνια αρχίζει να αναγνωρίζεται η σημασία των κυστιδίων της εξωτερικής μεμβράνης (outer membrane vesicles, OMVs) στην εμφάνιση της αντοχής. Τα OMVs είναι σφαιρικά κυστίδια (20-300 nm), προκύπτουν από προεκβολές της εξωτερικής μεμβράνης, έχουν συνεπώς την ίδια σύσταση σε πρωτεΐνες και λιπίδια, και απελευθερώνονται από τα gram-αρνητικά βακτήρια στο εξωτερικό περιβάλλον. Παρόμοια κυστίδια (όχι OMVs) πιθανώς εκκρίνονται και από τον *S.Aureus* και περιέχουν λακταμάσες τάξης A [156]. Τα OMVs έχει διαπιστωθεί ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση αντοχής είτε γιατί μεταφέρουν και απελευθερώνουν δραστικά ένζυμα αποδόμησης πχ β-λακταμάσες, εκτός του περιπλαστικού χώρου, είτε γιατί χρησιμεύουν ως απορροφητικά κυστίδια, τα οποία δεσμεύουν πάνω τους τα αντιβιοτικά απομακρύνοντάς τα από τον πραγματικό στόχο δράσης τους [137,157]. Παρουσία γενταμικίνης, η *P.aeruginosa* αυξάνει την απελευθέρωση OMVs που φέρουν υδρολυτικά ένζυμα [158]. Αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση OMVs παρατηρείται στην περίπτωση χορήγησης κολιστίνης οδηγώντας στην εμφάνιση αντοχής [159] (εικόνα23).



εικόνα 23: σχηματισμός των κυστιδίων εξωτερικής μεμβράνης (OMVs) από τα gram-αρνητικά. Συμβάλλουν στην αντοχή είτε γιατί περιέχουν τροποποιητικά ένζυμα είτε γιατί δεσμεύουν τα αντιβιοτικά εκείνα που στοχεύουν τον LPS. Μπορεί επίσης να περιέχουν και τμήματα DNA συμβάλλοντας στην HGT.

2.2.3 Συνεργητική δράση κυτταρικής και συλλογικής αντοχής

Η οργάνωση σε βιομεμβράνες ,εκτός από την ανάπτυξη της συλλογικής αντοχής (Community Level Resistance), συνιστά παράγοντα που μπορεί να επιδράσει ευνοϊκά στην εμφάνιση περεταίρω αντοχής σε κυτταρικό επίπεδο . Συγκεκριμένα: α) στο βιοφίλμ ο ρυθμός μεταλλάξεων είναι αυξημένος σε σύγκριση με αυτόν που έχουν τα ελεύθερα πλαγκτονικά κύτταρα (μέχρι και 100 φορές υψηλότερος), γεγονός που οδηγεί σε γρηγορότερη εμφάνιση μεταλλαγμένων ανθεκτικών στελεχών [160] .

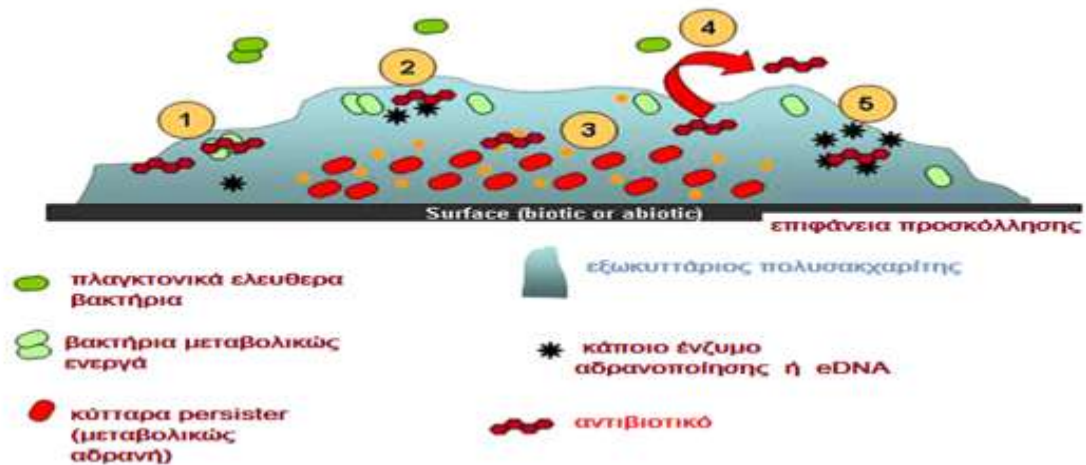
β) Ο στενός συγχρωτισμός των κυττάρων στις βιολογικές μεμβράνες ευνοεί την οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντοχής (Horizontal Gene Transfer,HGT) μεταξύ των βακτηρίων [161,162,188]. Επίσης, στις κοινότητες αυτές υπάρχει αφθονία εξωκυττάρου DNA, το οποίο τα κύτταρα μπορούν να προσλάβουν συμβάλλοντας στην εμφάνιση φαινοτύπων αντοχής.

γ) Εξαιτίας της μειωμένης διείσδυσης των αντιβιοτικών, σε κάποιες περιοχές του βιοφίλμ υπάρχουν υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ασκείται πίεση επιλογής για ανθεκτικά στελέχη χωρίς ο πληθυσμός τους να εκτίθενται σε βακτηριοκτόνα επίπεδα του φαρμάκου [163].

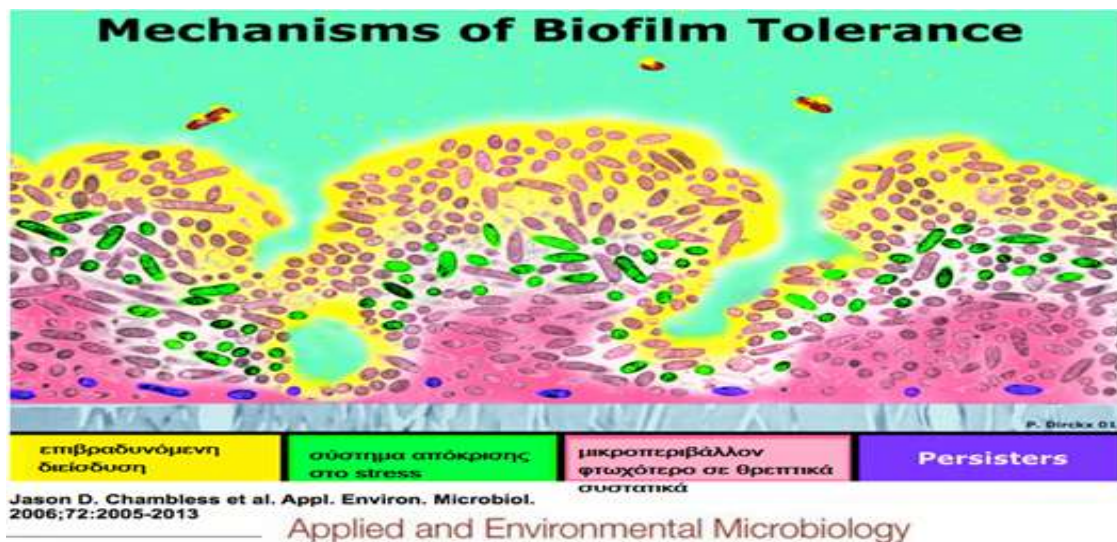
δ) Η απόκριση SOS (SOS response) εκτός από την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA και την ανάδειξη των επίμονων κυττάρων (persister cells) , είναι δυνατόν να επάγει την αναδιάταξη ιντεγκρονίων στο χρωμόσωμα και να ευοδώνει την απόκτηση εξωγενών γονιδιακών κασετών συμβάλλοντας στην επαγωγή και διάδοση της μικροβιακής αντοχής [164,186,193]

ε) Τα κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs) εκτός από λιποπολυσακχαρίτη LPS, πεπτιδογλυκάνη, μεμβρανικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες του περιπλασματικού χώρου , είναι δυνατόν να φέρουν τμήματα DNA στο εσωτερικό τους ή συνδεδεμένα στην επιφάνειά τους. Τα τμήματα αυτά DNA μπορεί να περιέχουν γονίδια αντοχής και κατά αυτό τον τρόπο τα OMVs συμβάλλουν στην HGT [157,165,166].

στ) Στις βιολογικές μεμβράνες *P.aeruginosa* και *E.coli* έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας των συστημάτων αντλιών εκροής *per se*, χωρίς την επίδραση κάποιου αντιβιοτικού [167].



εικόνα 24: τρόποι ανάπτυξης της συλλογικής αντοχής στις βιομεμβράνες 1) μειωμένη διείσδυση του αντιβιοτικού λόγω σύνδεσής του σε eDNA ή στις ομάδες του EPS . Συνθήκες στέρησης στο μικροπεριβάλλον πχ υποξία αναστέλλουν τη δράση ορισμένων αντιβιοτικών 2) ενζυματική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού 3) στα βαθύτερα στρώματα, ανάδειξη του φαινότυπου των persisters. Σε αυτά θα βασιστεί η αναγέννηση του πληθυσμού, όταν απομακρυνθεί το αντιβιοτικό 4) ενεργοποίηση αντλιών εκροής 5) ενεργοποίηση του συστήματος απόκρισης στο stress που ενισχύει τα κύτταρα και το βιοφίλμ συνολικά . Τροποποιημένο σχήμα από [148]



εικόνα 25: βακτήρια σε βιομεμβράνη. Υπάρχει ετερογένεια στις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος και στη μεταβολική κατάσταση του βακτηριακού πληθυσμού.

2.3 γενετική βάση της αντοχής

Η ανάπτυξη της αντοχής είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα γονίδια (mutations) ή/και απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλους μικροοργανισμούς μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT).

2.3.1 μεταλλάξεις γονιδίων

Στόχοι των περισσότερων αντιβιοτικών αποτελούν λειτουργικές ή δομικές μικροβιακές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Σημειακές μεταλλάξεις είναι δυνατόν να μεταβάλλουν τις πρωτεΐνες αυτές, με συνέπεια να μην μπορούν πια τα αντιβιοτικά να αλληλεπιδρούν με αυτές. Οι μεταλλάξεις είναι τυχαία συμβάματα, πιστεύεται ότι συμβαίνουν σε περίπου ένα στα 10^6 κύτταρα ως 1 στα 10^7 κύτταρα. Μπορούν να συμβούν τόσο σε ενδογενή γονίδια, κωδικοποιώντας πχ μεταλλαγμένες PBPs, όσο και σε επίκτητα γονίδια οδηγώντας πχ στην εμφάνιση παραγώγων της TEM-1, της πρώτης πλασμιδιακής β-λακταμάσης [120].

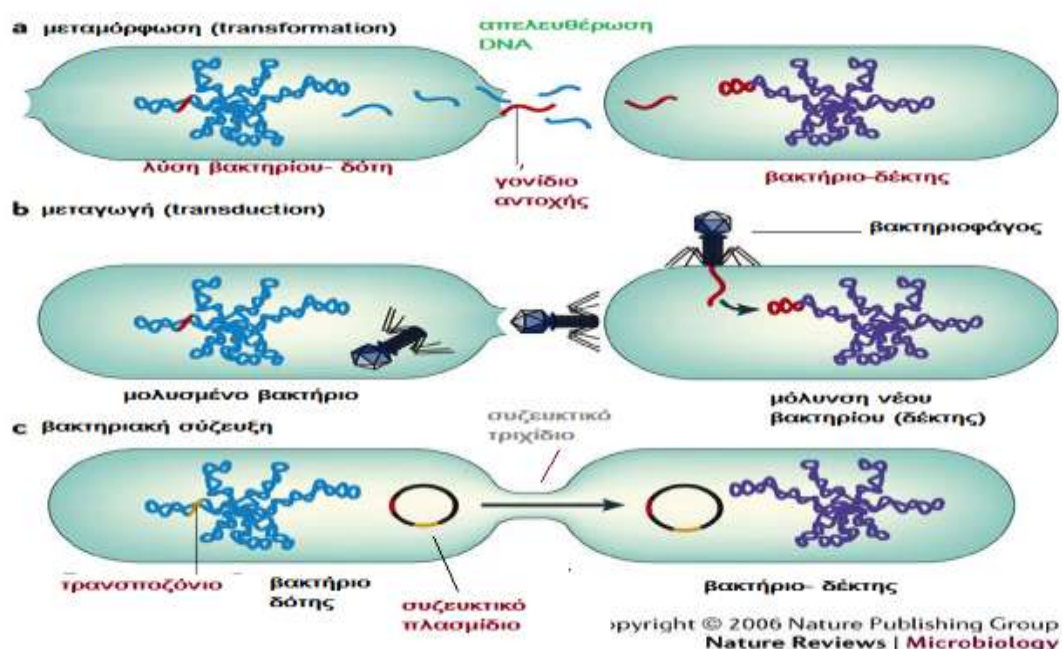
2.3.2 απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού

Τα γονίδια αντοχής βρίσκονται σε εξωχρωμοσωματικά γενετικά στοιχεία ή σε τμήματα ενσωματωμένα στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Οι πρώτες καταγραφές ανάπτυξης αντοχής λόγω HGT έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1950 [168]. Η απόκτηση των γονιδίων αντοχής γίνεται με τους εξής μηχανισμούς:

(i) σύζευξη (conjugation). Είναι ο κυριότερος μηχανισμός μεταβίβασης γονιδίων αντοχής στα gram-αρνητικά. Γίνεται με μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων. Τα συζευκτικά πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωματικά κυκλικά μόρια DNA και μπορούν να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής. Κάποια πλασμίδια έχουν στενό φάσμα ξενιστών, ενώ άλλα μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ πολλών ειδών βακτηρίων. Τα πλασμίδια αυτά μπορούν να ενσωματώνονται στο DNA του ξενιστή σταθεροποιώντας ακόμα περισσότερο τη γενετική πληροφορία που μεταφέρουν. Για να γίνει η σύζευξη, τα δύο βακτήρια, δότης και δέκτης, έρχονται σε άμεση επαφή και τα πλασμίδια μεταβιβάζονται από το ένα κύτταρο στο άλλο διαμέσου συζευκτικού τριχιδίου (sex pilus) [169,189].

(ii) μεταμόρφωση (transformation). Είναι ο πιο απλός μηχανισμός απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού. Κάποια βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν τμήματα DNA που βρίσκονται ελεύθερα στο περιβάλλον μετά από λύση των βακτηρίων που τα περιείχαν αρχικά. Τα τμήματα αυτά DNA εισέρχονται στο βακτήριο-δέκτη και ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα σχηματίζοντας με ομόλογο ανασυνδυασμό τα μωσαϊκά γονίδια. Ο μηχανισμός αυτός είναι συχνός στα gram-θετικά [170,187].

(iii) μεταγωγή (transduction). Είναι μηχανισμός με τον οποίο μεταφέρονται τμήματα χρωμοσωματικού DNA από το ένα βακτήριο στο άλλο μέσω των βακτηριοφάγων. Οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί που προσβάλλουν τα βακτήρια [171].



εικόνα 26: μηχανισμοί απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού, που μπορεί να περιέχει και γονίδια αντοχής. Προσαρμοσμένο σχήμα.

2.3.3. Μεταθετά γενετικά στοιχεία

Τα μεταθετά γενετικά στοιχεία (mobile genetic elements , MGEs) είναι αλληλουχίες DNA, που μπορούν να αλλάξουν θέσεις στο ίδιο χρωμόσωμα ή να ανταλλάσσονται μεταξύ χρωμοσωμάτων, μεταξύ βακτηρίων, ακόμη και μεταξύ των ειδών. Τα μεταθετά στοιχεία συνιστούν ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος πολλών μικροοργανισμών και παίζουν ρόλο στην επιβίωση και ανάπτυξη, στη λοιμογόνο

δύναμη και στην ανάπτυξη αντοχής. Τα MGEs που χρησιμεύουν ως οχήματα για τη μεταφορά των γονιδίων αντοχής είναι τα πλασμίδια, τα μεταθετόνια (τρανσποζόνια) και οι γονιδιακές κασέτες [172,190].

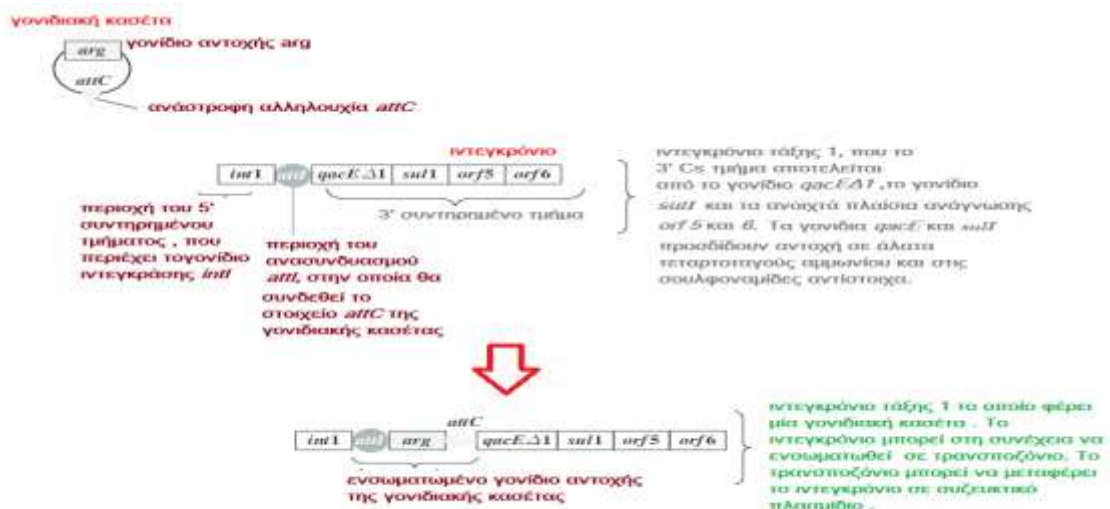
α) πλασμίδια (plasmids). Πρόκειται για εξωχρωμοσωματικά κυκλικά τμήματα δίκλωνου DNA, που αντιγράφονται αυτόνομα εντός των βακτηριακών κυττάρων και φέρουν γονίδια που μπορούν να φανούν χρήσιμα για την επιβίωση του κυττάρου σε μεταβολές του περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, τα πλασμίδια μπορεί να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν ως τοξίνες ή ως λοιμογόνοι παράγοντες, να φέρουν γονίδια που επιτρέπουν στα βακτήρια να χρησιμοποιούν ιδιαίτερες οργανικές ενώσεις, όταν ελαττώνονται τα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος, ή γονίδια που προσδίδουν αντοχή έναντι βαρέων μετάλλων. Τα πλασμίδια, όμως, μπορούν να φέρουν και γονίδια αντοχής έναντι των αντιβιοτικών. Τα πλασμίδια ταξινομούνται σε ομάδες ασυμβατότητας (Incompatibility groups, Inc groups). Ένα βακτήριο μπορεί να φιλοξενεί διαφορετικούς τύπους πλασμιδίων, ωστόσο, διαφορετικά πλασμίδια μπορούν να συνυπάρξουν στο ίδιο βακτήριο, μόνο εάν είναι συμβατά. Συμβατά χαρακτηρίζονται τα πλασμίδια που δεν μοιράζονται τους ίδιους μηχανισμούς αντιγραφής. Εάν δύο πλασμίδια δεν είναι συμβατά, το ένα από τα δύο θα χαθεί γρήγορα από το κύτταρο. Τα πλασμίδια συνεπώς κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες ασυμβατότητας (Inc groups) ανάλογα με το αν ελέγχονται από διαφορετικά συστήματα αντιγραφής. Τα συμβατά πλασμίδια, επομένως, ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες ασυμβατότητας, καθώς δεν μοιράζονται το ίδιο σύστημα αντιγραφής, και μπορούν να συνυπάρξουν στο ίδιο βακτήριο (κατ' επέκταση και τα γονίδια αντοχής που φέρουν) προσδίδοντας φαινότυπο πολλαπλής αντοχής [173].

β) τρανσποζόνια (transposons, Tn). Είναι μεταθετά στοιχεία που, εκτός από τα γονίδια τα υπεύθυνα για τη μετακίνησή τους, φέρουν και τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Τα τρανσποζόνια έχουν την ικανότητα να κατευθύνουν τη μετάθεσή τους από τη μία περιοχή του χρωμοσώματος σε άλλη, αλλά και από ένα πλασμίδιο σε ένα άλλο ή από το πλασμίδιο στο χρωμόσωμα και αντιστρόφως. Ανακαλύφθηκαν από την Barbara McClintock, η οποία μίλησε για γονίδια που «χοροπηδούν» μέσα στο γονιδίωμα (jumping genes). Τιμήθηκε για αυτή της την ανακάλυψη με το βραβείο Νόμπελ το 1983. Τα τρανσποζόνια

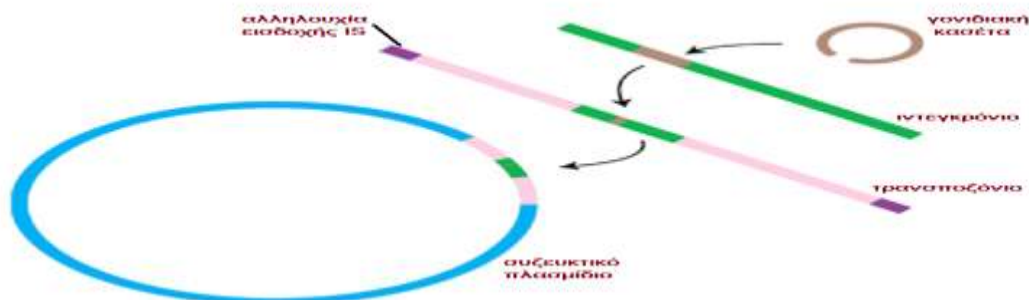
διακρίνονται σε σύνθετα και απλά. Στα σύνθετα τρανσποζόνια, τα γονίδια αντοχής πλαισιώνονται από αλληλουχίες παρεμβολής ή εισδοχής (Insertion Sequences, IS) σε παράλληλη ή αντιπαράλληλη διάταξη. Οι αλληλουχίες παρεμβολής (IS) είναι μικρού μεγέθους 700-5000bp και περιέχουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη μετακίνηση και τις αλληλουχίες αναγνώρισης για την μετακίνηση. Στα απλά τρανσποζόνια, τα γονίδια αντοχής πλαισιώνονται όχι από αλληλουχίες παρεμβολής IS, αλλά από αλληλουχίες ανάστροφων επαναλήψεων (inverted repeats, IR). Οι αλληλουχίες ανάστροφων επαναλήψεων (IR) είναι μικρότερου μήκους (< 50bp) και περιέχουν μόνο το γονίδιο για το ένζυμο μετακίνησης (τη μεταθετάση) και το γονίδιο για το ένζυμο που μετέχει στον ανασυνδυασμό (τη ρεσολβάση). Τα τρανσποζόνια της οικογένειας *Tn21* αποτελούν την πιο ευρέως διαδεδομένη κατηγορία μεταθετών τμημάτων στα Gram- αρνητικά βακτήρια [174,175].

γ) γονιδιακές κασέτες (gene cassettes). Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά τμήματα κυκλικού DNA, μεγέθους περίπου 500- 1000bp. Έχουν αναφερθεί περισσότερες από 100 γονιδιακές κασέτες που κωδικοποιούν αντοχή έναντι αντιβιοτικών. Υπάρχουν, για παράδειγμα, γονιδιακές κασέτες που κωδικοποιούν γονίδια β-λακταμασών σε πολλά είδη εντεροβακτηριακών. Κάθε γονιδιακή κασέτα αποτελείται από ένα γονίδιο αντοχής μαζί με μία μικρή ανάστροφη αλληλουχία 59 περίπου βάσεων, που ονομάζεται στοιχείο 59 βάσεων (59-be ή *attC*) και λειτουργεί ως ειδική θέση ανασυνδυασμού στο εσωτερικό του ιντεγκρονίου. Τα στοιχεία *attC* δεν είναι ταυτόσημα μεταξύ τους, αλλά διαφέρουν τόσο ως προς το μήκος (από 57 ως 141bp) όσο και ως προς τη σύνθεση. Τα ενσωματόνια (ιντεγκρόνια, integrons) είναι γενετικές δομές ικανές να ενσωματώσουν τις γονιδιακές κασέτες. Αποτελούνται από τις 3 διακριτές περιοχές: τις δύο συντηρημένες περιοχές DNA (διατηρημένα τμήματα 5'Cs και 3'Cs) και την ενδιάμεση μεταβλητή περιοχή, στην οποία ενσωματώνονται οι γονιδιακές κασέτες. Το 5' συντηρημένο τμήμα (5'Cs) περιέχει: i) το γονίδιο της ιντεγκράσης (*intI*) ii) τον εκκινητή των γονιδίων αντοχής (συνήθως ένας και σε ορισμένες περιπτώσεις δυο), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μεταγραφή των γονιδίων των κασετών iii) τη θέση γενετικού ανασυνδυασμού (*attI*) που αναγνωρίζεται από την ιντεγκράση και αποτελεί τη θέση όπου ενσωματώνονται οι γονιδιακές κασέτες. Το 3' συντηρημένο τμήμα (3'Cs) φέρει συνήθως δύο ανοικτά

πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORF) και διαφέρει στις διάφορες τάξεις των ιντεγκρονίων. Η ενσωμάτωση των γονιδιακών κασετών στο μεταβλητό τμήμα των ιντεγκρονίων αποτελεί μια ειδική ως προς την θέση εισδοχή (site specific insertion) που καταλύεται από το ένζυμο ιντεγκράση, γίνεται σε προϋπάρχουσες ειδικές θέσεις γενετικού ανασυνδυασμού (*attI*) και πάντα από το 5' προς το 3' άκρο του μεταβλητού τμήματος. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν περιγραφεί τέσσερις τάξεις ιντεγκρονίων ανάλογα με την αλληλουχία του γονιδίου της ιντεγκράσης (1^η ως 4^η). Τα πιο διαδεδομένα είναι τα ιντεγκρόνια πρώτης τάξης. Υπολογίζεται ότι βρίσκονται στο 40- 70% των gram-αρνητικών παθογόνων. Τα ιντεγκρόνια 1^{ης} τάξης συνήθως περιέχουν μία έως έξι γονιδιακές κασέτες. Επομένως, μπορεί να συνυπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή στις κινολόνες, τις αμινογλυκοσίδες, την κοτριμοξαζόλη και τα β-λακταμικά. Επίσης, στο συντηρημένο 3Cs τμήμα υπάρχουν γονίδια όπως *sul1* ή το *aadA*, που είναι υπεύθυνα για την αντοχή στις σουλφοναμίδες και τη στρεπτομυκίνη αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτή η χορήγηση ενός αντιβιοτικού πχ κινολόνης επιλέγει μικροβιακούς πληθυσμούς με αντοχή όχι μόνο στις κινολόνες αλλά και στις άλλες ομάδες αντιβιοτικών, για τις οποίες συνυπάρχουν τα γονίδια αντοχής στο εν λόγω ιντεγκρόνιο [237]. Η ταχεία εξάπλωσή τους μέσω των gram-αρνητικών, και προσφάτως και σε gram-θετικά, διευκολύνεται με τη μεταφορά τους σε μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια ή/και πλασμίδια) με συνέπεια την εμφάνιση αντοχής και τον περιορισμό των θεραπευτικών επιλογών [176,177,178].



εικόνα 26: παράδειγμα ενσωμάτωσης γονιδίου αντοχής σε ιντεγκρόνιο τάξης 1.



εικόνα 27: Γονιδιακή κασέτα , που φέρει ένα γονίδιο αντοχής και το στοιχείο attC, ενσωματώνεται στην ειδική θέση ανασυνδυασμού attI στη μεταβλητή περιοχή του ιντεγκρονίου με τη βοήθεια της ιντεγκράσης ,το γονίδιο της οποίας εντοπίζεται στο 5' συντηρημένο τμήμα του ιντεγκρονίου. Στο ίδιο τμήμα μπορεί να περιέχεται ένας εκκινήτης P_C , που διευκολύνει την έκφραση της ενσωματωμένης γονιδιακής κασέτας. Το ιντεγκρόνιο στη συνέχεια μπορεί να ενσωματωθεί σε τρανσποζόνιο, το οποίο περιέχει γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη μετακίνησή του και ενσωμάτωση του (γονίδιο της μεταθετάσης και αλληλουχίες εισδοχής) σε άλλη θέση του γενετικού υλικού πχ σε ένα συζευκτικό πλασμίδιο. Το πλασμίδιο μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο βακτήριο του ίδιου ή διαφορετικού είδους.

2.3.4. Γονιδίωμα αντοχής (Resistome)

Το γονιδίωμα αντοχής είναι μία έννοια που προτάθηκε από τον G.D.Wright για να περιγράψει το σύνολο των γνωστών και αγνώστων γονιδίων αντοχής σε παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη σε όλα τα δυνατά περιβάλλοντα του πλανήτη πχ από τον εντερικό αυλό ανθρώπων και ζώων ως το παγωμένο αρκτικό έδαφος, τους ωκεανούς , τις απομονωμένες σπηλιές κοκ [116,179,180,181,188,189]. Το γονιδίωμα αντοχής είναι πανάρχαιο και περιλαμβάνει : i) τα γονίδια εγγενούς ή επίκτητης αντοχής που εντοπίζονται στα παθογόνα στελέχη. ii) τα γονίδια αντοχής που παρέχουν αυτοπροστασία στους μη παθογόνους μικροοργανισμούς που συνθέτουν οι ίδιοι αντιβιοτικά. iii) τα γονίδια που προέκυψαν από πρώτο-ανθεκτικά γονίδια (protoresistant genes). Τα γονίδια αυτά δεν προσδίδουν φαινότυπο αντοχής στην αρχική τους μορφή , όμως μπορούν με ξεχωριστά εξελικτικά βήματα να αποκτήσουν κλινική σημασία αντοχής. Παραδείγματα πρωτοανθεκτικών γονιδίων είναι: το γονίδιο της νουκλεοτιδυλοπολυμεράσης, που εξελίχθηκε στο γονίδιο αντοχής αμινογλυκοσιδική νουκλεοτιδυλοτρανσφεράση (ANT) , και το γονίδιο της αμινογλυκοσιδικής ακετυλοτρανσφεράσης *aac(6')-Ia-cr* , που προσδίδει αρχικά αντοχή στην καναμυκίνη, αλλά με μεταλλάξεις που οδηγούν στις αμινοξικές

υποκαταστάσεις Trp102Arg και Asp179Tyr επεκτείνεται το φάσμα αντοχής στη σιπροφλοξασίνη και νορφλοξασίνη [182]. iv) τα σιωπηλά γονίδια, που είναι μεν λειτουργικά, αλλά δεν εκφράζονται. Η παρουσία τους αναγνωρίζεται επειδή η αλληλουχία τους εμφανίζει ομολογία με γνωστά γονίδια αντοχής. Τα σιωπηλά γονίδια δεν προσδίδουν φαινότυπο αντοχής παρά μόνο με μετάλλαξη ή μετάθεση .

3. επιδημιολογία αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Ενώ αρκετά είδη αρνητικών κατά gram βακτηρίων αποτελούν το κύριο συστατικό της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου, πολλά είδη gram-αρνητικών ανήκουν στα κοινά παθογόνα, που είναι υπεύθυνα για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών πχ λοιμώξεις ουροποιητικού και γαστρεντερικού, ενώ μερικά από αυτά συνιστούν σοβαρές αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων όπως *E.coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp σε βακτηριαιμίες, λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου κοκ. Κατά το παρελθόν ήταν ευαίσθητα σε πολλά αντιβιοτικά , όμως τα τελευταία χρόνια , η ανάπτυξη αντοχής των gram- αρνητικών βακτηρίων βρίσκεται σε άνοδο παγκοσμίως , αν και στην Ελλάδα καταγράφεται τα 4 τελευταία χρόνια σχετική μείωση [194,195,196] .Το CDC έχει ταξινομήσει τις τρέχουσες στις ΗΠΑ «απειλές» λόγω αντοχής ,σε 3 επίπεδα σοβαρότητας (επείγον, σοβαρό και ανησυχητικό) .Συγκεκριμένα , αφορούν σε gram-αρνητικά : οι δύο από τις 3 επείγουσες απειλές (ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακά και ανθεκτική *N.gonorrhoeae*) και οι επτά από τις 12 σοβαρές απειλές (MDR *Acinetobacter*, ανθεκτικά *Campylobacter* spp , *non-typhoidal Salmonella*, *S.Typhi* και *Shigella* spp, MDR *P.aeruginosa* και ESBL- εντεροβακτηριακά). Το Μάρτιο του 2017 και ο ΠΟΥ εξέδωσε μία λίστα με τις 12 σοβαρότερες βακτηριακές απειλές . Τις 3 πρώτες θέσεις καταλαμβάνουν ανθεκτικά gram-αρνητικά : ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii* και *P.aeruginosa* και εντεροβακτηριακά που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες ή που παράγουν ESBLs . Gram-αρνητικά βακτήρια είναι και τα περισσότερα από τα ESKAPE παθογόνα , όπως αποκαλείται η μικρή ομάδα παθογόνων που κατέχει, όμως, τη μερίδα του λέοντος στις νοσοκομειακές λοιμώξεις (*E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A. baumannii*, *P.aeruginosa* , *Enterobacter* spp) [2,19,51,197,427].

3.1 νοσοκομειακές λοιμώξεις από gram-αρνητικά

Αν και οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αποτελούν τη συχνότερη «επιπλοκή» της άσκησης της σύγχρονης ιατρικής, η ακριβής επίπτωσή τους παγκοσμίως παραμένει αδιευκρίνιστη. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. υπολογίζεται ότι 7% των νοσηλευόμενων ασθενών στις χώρες υψηλού εισοδήματος και 15% στις LMICs αναπτύσσουν τουλάχιστον μία νοσοκομειακή λοίμωξη κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Το ποσοστό αυτό τριπλασιάζεται κατά την περίθαλψη σε μονάδα εντατικής θεραπείας [199,200].

Figure 3.3
Prevalence of health care-associated infection in high-income countries, 1995-2010*

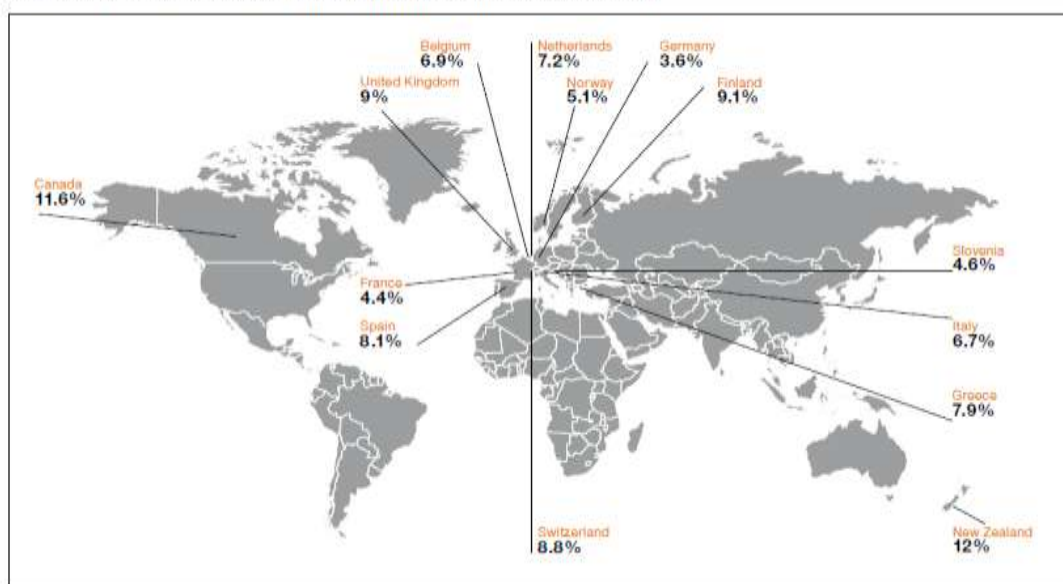
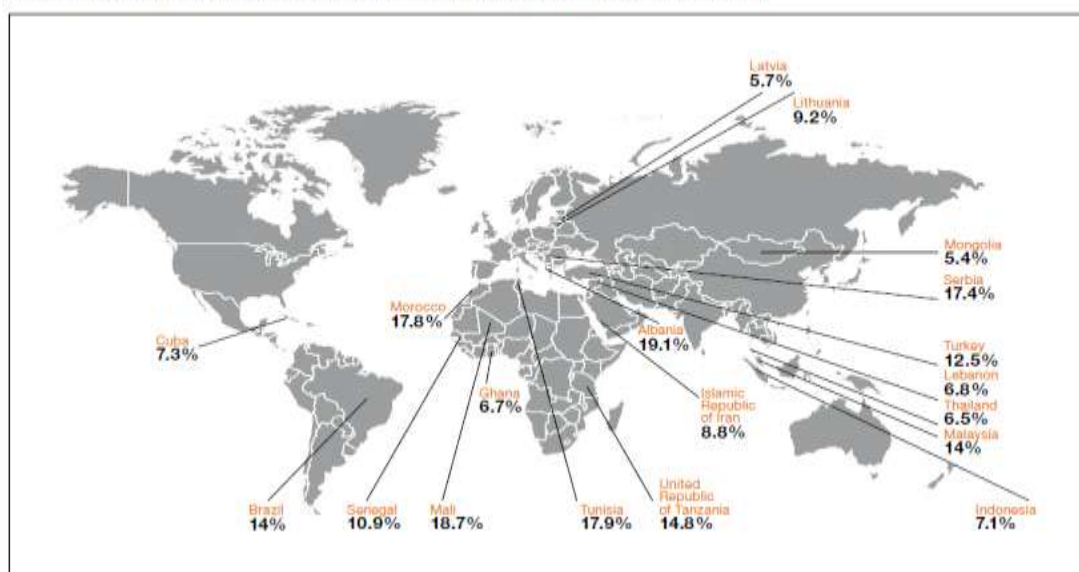


Figure 4.2
Prevalence of health care-associated infection in low- and middle-income countries, 1995-2010



Για να θεωρηθεί μία λοίμωξη νοσοκομειακή (Hospital acquired Infection, HAI) θα πρέπει να ισχύουν ένα από τα ακόλουθα:

α) τα συμπτώματα της λοίμωξης δεν ήταν παρόντα κατά την εισαγωγή του ασθενούς και εμφανίστηκαν την 3^η μέρα νοσηλείας ή αργότερα (η ημέρα εισαγωγής λογίζεται ως 1^η μέρα νοσηλείας).

β) όταν ο ασθενής που εισήχθη στο νοσοκομείο είχε συμπτώματα λοίμωξης κατά την εισαγωγή ή τα εμφάνισε τις δύο πρώτες μέρες νοσηλείας του και: i) είχε πάρει εξιτήριο από νοσοκομείο τις τελευταίες 48 ώρες ή ii) είχε χειρουργηθεί τον προηγούμενο μήνα (ή επί τοποθέτησης εμφυτεύματος, το τελευταίο τρίμηνο) ή iii) είχε πάρει εξιτήριο τις τελευταίες 28 ημέρες και πληροί τα κριτήρια για λοίμωξη από *Clostridium difficile* ή iv) στον ασθενή τοποθετήθηκε παρεμβατική συσκευή τις 2 πρώτες ημέρες νοσηλείας του με αποτέλεσμα την εκδήλωση λοίμωξης πριν την 3η ημέρα νοσηλείας.

Δύο ειδικές καταστάσεις που δεν θεωρούνται λοιμώξεις είναι πρώτον, ο αποικισμός, που ορίζεται ως η παρουσία μικροοργανισμών (στο δέρμα, τους βλεννογόνους, τα ανοιχτά τραύματα, τις απεκκρίσεις κ.α.) που δεν προκαλούν κλινικά σημεία ή συμπτώματα λοίμωξης και δεύτερον, η φλεγμονή από μη λοιμώδεις παράγοντες [201].

Η.Π.Α.: Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, σύμφωνα με τα στοιχεία του CDC, το 2011 κατεγράφησαν 721.800 νοσοκομειακές λοιμώξεις, αφορούν δηλαδή περίπου 1 στους 25 νοσηλευόμενους, με δυσμενείς συνέπειες στους δείκτες της νοσηρότητας, της θνησιμότητας, καθώς επίσης στη διάρκεια και το κόστος της νοσηλείας. Υπολογίζονται ότι 75000 ασθενείς που είχαν HAI πέθαναν κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους καθιστώντας τις HAIs έκτη αιτία θνησιμότητας. Σύμφωνα με πολυκεντρική μελέτη σε πολλές πολιτείες, οι πέντε συχνότερες αιτίες HAIs ήταν: 1) πνευμονία (το 39% αυτών σχετιζόταν με μηχανική υποστήριξη αναπνοής, ventilator-associated pneumonia, VAP) 2) οι λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου (surgical-site infections, SSI) 3) οι λοιμώξεις γαστρεντερικού (το 70,9% αυτών αφορούσαν σε λοίμωξη από *C. difficile*) 4) οι λοιμώξεις ουροποιητικού (το 67,7% αυτών αφορούσαν σε λοίμωξη σχετιζόμενη με καθετήρα, catheter associated

urinary tract infection, CAUTI) 5) οι πρωτοπαθείς αιματογενείς λοιμώξεις (το 84,0% αυτών συνδεόταν με κεντρικό ενδαγγειακό καθετήρα , Central Line-associated Bloodstream Infection, CLABSI). Στην ίδια μελέτη, τα 10 συχνότερα απομονωθέντα παθογόνα ήταν: 1) *C.difficile* (12,1%) 2) *S.aureus* (10,7%) 3) *Klebsiella* spp (10,3%) 4) *Escherichia coli* (9,3%) 5) *Enterococcus* spp (8,7%) 6) *P.aeruginosa* (7,1%) 7) *Candida* spp (6,3%) 8) *Streptococcus* spp (5%) 9) CNS(4,8%) 10) *Enterobacter* spp (3,2%) . Από τα 10 ,δηλαδή, συχνότερα μικροβιακά αίτια των HAIs , τα τέσσερα είναι gram-αρνητικά [202,203]. Κατανοώντας τη σοβαρότητα της κατάστασης , τον Απρίλιο του 2013 ξεκίνησε το σχέδιο « HAI Action Plan» σε εθνικό πια επίπεδο , που αντανακλά μια σημαντική αναβάθμιση και επέκταση του αρχικού σχεδίου (2009) . Είναι σχέδιο επιτήρησης και παρέμβασης, που επεκτάθηκε ώστε -εκτός των νοσοκομείων- να συμπεριλαμβάνει τα χειρουργικά κέντρα ημέρας, τις μονάδες τεχνητού νεφρού και τις εγκαταστάσεις μακροχρόνιας φροντίδας [204]. Τον Μάρτιο του 2016 δημοσιεύτηκε έκθεση προόδου , στην οποία περιγράφονται σημαντικές μειώσεις σε εθνικό επίπεδο σχεδόν σε όλες τις HAIs συγκριτικά με τα δεδομένα εκκίνησης [205]. Η ιστορία της επιτήρησης και παρέμβασης στις ΗΠΑ ξεκινά στα μέσα της δεκαετίας του 1970, όταν ξεκίνησε η δεκαετής μελέτη S.E.N.I.C. (Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control , Μελέτη της Αποτελεσματικότητας του Ελέγχου των Νοσοκομειακών Λοιμώξεων) , που αποτελεί σημείο αναφοράς στη σύγχρονη ιστορία της επιτήρησης των νοσοκομειακών λοιμώξεων . Με το πρόγραμμα αυτό σημειώθηκε μείωση κατά 32% των HAIs [206].

Ευρωπαϊκή Ένωση και Ελλάδα : Στην Ε.Ε. υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο περίπου 4,1 εκατ. ασθενείς νοσούν από HAIs με εκτιμώμενο αριθμό θανάτων να αγγίζει τις 37.000. Υπολογίζεται ότι ένας στους 18 νοσηλευόμενους αναπτύσσει HAI. Περίπου το 20-30% των νοσοκομειακών λοιμώξεων θεωρούνται ότι μπορούν να προληφθούν με εντατικά προγράμματα υγιεινής και ελέγχου. Παρόμοιο πρόβλημα αντιμετωπίζουν και τα ελληνικά νοσοκομεία , τα οποία κυρίως κατά την τελευταία δεκαετία έρχονται αντιμέτωπα με την αύξηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία υπολογίζεται ότι προκαλούν περίπου 5000 σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις και περισσότερους από 1000 θανάτους ετησίως.

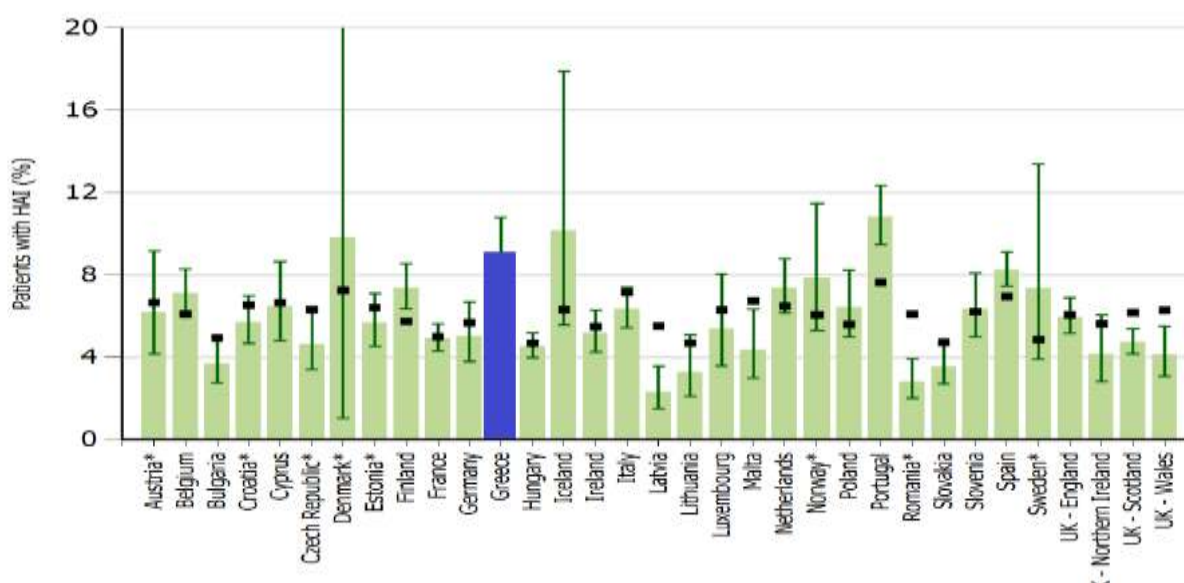
Το ECDC πραγματοποίησε την πρώτη μελέτη σημειακού επιπολασμού των HAIs στα ευρωπαϊκά νοσοκομεία το 2011-2012 (PSS) και σύμφωνα με την έκθεσή του, τα μικρόβια που συχνότερα απομονώνονταν σε HAIs ήταν, κατά φθίνουσα σειρά: 1) *E.coli* (15.9%) 2) *S.aureus* (12.3%) 3) *Enterococcus* spp (9.6%) 4) *P.aeruginosa* (8.9%) 5) *Klebsiella* spp. (8.7%) 6) CNS (7.5%) 7) *Candida* spp (6.1%) 8) *C.difficile* (5.4%) 9) *Enterobacter* spp (4.2%) 10) *Proteus* spp (3.8%) και 11) *Acinetobacter* spp (3.6%).

Από τα συχνότερα αίτια των HAIs, τα 6 είναι gram-αρνητικά. Τα εντεροβακτηριακά επικράτησαν στις λοιμώξεις ουροποιητικού, ενώ τα αζυμωτικά gram – αρνητικά, κυρίως η *P.aeruginosa* και το *A.baumannii* στις πνευμονίες. Ο μέσος επιπολασμός των HAIs στην Ε.Ε. το 2012 είναι 6% και οι 5 συνηθέστεροι τύποι νοσοκομειακών λοιμώξεων ήταν : 1) λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού (23%) 2) λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου (20%) 3) λοιμώξεις ουροποιητικού (19%) 4) αιματογενείς λοιμώξεις (11%) 5) λοιμώξεις γαστρεντερικού (8%).

Στην Ελλάδα , ο επιπολασμός των HAIs το 2012 ανέρχεται στο 9,1% με ετήσια επίπτωση 5,2% , δηλαδή κατά προσέγγιση 121.142 ασθενείς κάθε έτος εμφανίζουν νοσοκομειακή λοίμωξη. Ο κίνδυνος θανάτου στις 90 ημέρες νοσηλείας αυξάνεται κατά 80% σε ασθενή με ενδονοσοκομειακή λοίμωξη σε σύγκριση με ασθενή που δεν έχει HAI (HR 1,8, 95% CI 1,3-2,6). Η θνητότητα στις 30 και στις 90 ημέρες είναι αντίστοιχα 9,7% και 23,2% , με τον παθολογικό τομέα και τις ΜΕΘ να σημειώνουν τα υψηλότερα ποσοστά. Από τα είδη των λοιμώξεων, οι πνευμονίες και οι βακτηριαιμίες εμφανίζουν την υψηλότερη θνητότητα. Ο μέσος όρος επιπλέον ημερών νοσηλείας είναι 4.3 επιπρόθετες ημέρες (95% CI 2.4–6.2). Ειδικά, όταν πρόκειται για ανθεκτικά Gram-αρνητικά στελέχη , ο μέσος όρος πρόσθετων ημερών νοσηλείας υπερβαίνει τις 2 εβδομάδες (16.9 ημέρες , 95% CI 12.9–20.9) και ειδικά για τα ανθεκτικά στις καρβαπενεμες να υπερβαίνει τις 20 ημέρες [207,467]. Το 2012, οι συχνότεροι τύποι HAIs είναι : 1) λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού (27%) 2) λοιμώξεις ουροποιητικού (17%) 3) αιματογενείς λοιμώξεις (19%) 4) λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου (11%) 5) λοιμώξεις γαστρεντερικού (4%).

Τα συχνότερα απομονωθέντα παθογόνα αίτια το 2012 είναι: 1) *Klebsiella* spp (18%) 2) *P.aeruginosa* (16,8%) 3) *Acinetobacter* spp (16,8%) 4) *Enterococcus* spp (8,9%) και 5) *E.coli* (8,3%) (βλ. πίνακες και διαγράμματα).

Το Νοέμβριο του 2016 πραγματοποιήθηκε η 2η μελέτη σημειακού επιπολασμού των HAIs, της οποίας τα αποτελέσματα αναμένονται να δημοσιευθούν στο ECDC. Σε προφορικές ανακοινώσεις του ΚΕΕΛΠΝΟ σε συνέδρια το τρέχων έτος, ο γενικός επιπολασμός νοσοκομειακών λοιμώξεων το 2016 είναι 8,9%. Οι παθολογικές κλινικές είχαν και πάλι το υψηλότερο ποσοστό όσον αφορά στον επιπολασμό (10,2%), όμως με μικρότερη χρήση αντιβιοτικών (56%), ο χειρουργικός τομέας είχε ποσοστό λοιμώξεων 7,9% με χρήση αντιβιοτικών στο 65,4% και στις ΜΕΘ ο επιπολασμός HAI είναι 31,7% με χρήση αντιβιοτικών στο 65,1%. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση HAIs είναι η ηλικία > 55 ετών και η παρουσία ενδαγγειακών καθετήρων. Σύμφωνα με τα αδημοσίευτα στοιχεία από τη μελέτη επιπολασμού 2016, παρατηρήθηκε αύξηση μόνο στις λοιμώξεις του αναπνευστικού. Οι χειρουργικές λοιμώξεις είναι ακριβώς στο ίδιο επίπεδο. Οι λοιμώξεις ουροποιητικού και οι βακτηραιμίες σημείωσαν μείωση. Όσον αφορά στα είδη των παθογόνων το 2016 η σειρά άλλαξε και κατά φθίνουσα σειρά αυτά είναι: 1) *Acinetobacter* spp 2) *Klebsiella* spp 3) *P.aeruginosa* 4) *E.coli* και 5) *S.aureus*.



εικόνα 28: ποσοστά εμφάνισης λοιμώξεων σχετιζομένων με χώρους παροχής υγείας στα κράτη της Ε.Ε. Το 2012 ο ευρωπαϊκός μέσος όρος είναι 6%. Στην Ελλάδα, το ποσοστό HAIs είναι 9%. Το 2016 στην Ελλάδα το ποσοστό κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (8,9%) (αδημοσιεύτα δεδομένα)

Τύπος ΗΑΙ	Ε.Ε.	Ελλάδα 2012
LRTI	23%	27%
SSI	20%	11%
UTI	19%	17%
BSI	11%	19%
GI	8 %	4%
HAIs	6%	9%

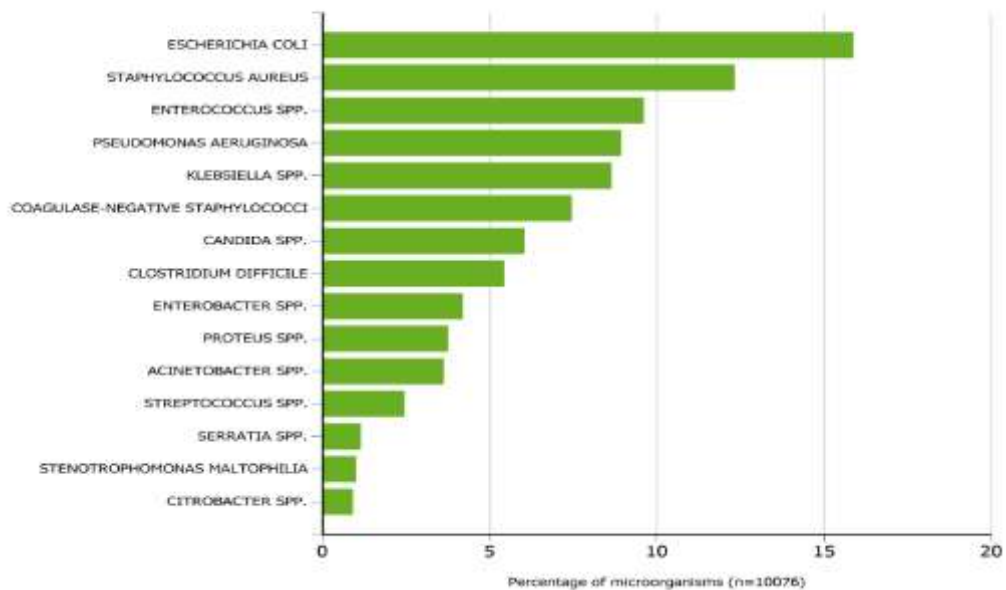
Κατανομή ΗΑIs σε κλινικές πτέρυγες	Ε.Ε.	Ελλάδα 2012	2016
χειρουργικές	7,0%	6,4%	7,9%
παθολογικές	5,7%	10,1%	10,2%
ΜΕΘ	21,1%	31,0%	31,7%

συχνότητα απομόνωσης υπεύθυνων μο για ΗΑIs	Ε.Ε.	Ελλάδα
Gram-θετικοί κόκκοι	32,71%	19,5%
εντεροβακτηριακά	36,19%	37,23%
<i>A.baumannii</i>	3,15%	15,96%
<i>P.aeruginosa</i>	8,96%	16,84%

ποσοστά αντοχής	Ε.Ε.	Ελλάδα
MRSA	41,2%	50,0%
VRE	10,2%	12,5%
Εντεροβακτηριακά σε 3GC	33,4%	69,3%
Εντεροβακτηριακά σε CAR	7,6%	39,9%
<i>Klebsiella</i> spp σε CAR	19,3%	67%
<i>A. baumannii</i> σε CAR	81,2%	83%
<i>P.aeruginosa</i> σε CAR	31,8%	49,4%

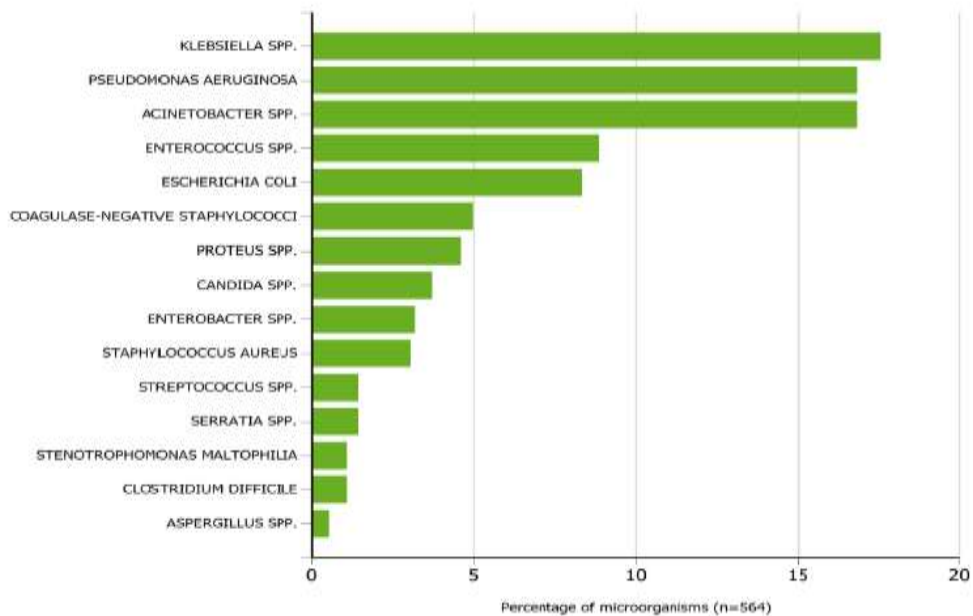
εικόνα 29: (α) οι συχνότεροι 5 τύποι ΗΑIs στην Ελλάδα και στην Ε.Ε και ο μέσος όρος (β) κατανομή των ΗΑIs ανά κλινική πτέρυγα (γ) συχνότητα απομονωθέντων βακτηρίων υπεύθυνων για ΗΑIs (δ) ποσοστό ανθεκτικών βακτηρίων υπεύθυνων για ΗΑIs . LRTI: λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού UTI: λοίμωξη ουροποιητικού, SSI: λοίμωξη χειρουργικού πεδίου, BSI: αιματογενείς λοιμώξεις, GI: λοιμώξεις γαστρεντερικού. 3GC: κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς CAR: καρβαπενέμες. Στοιχεία από ECDC (PSS 2011-2012).

Most frequently isolated microorganisms in HAIs (all HAI types) in acute care hospitals in EU/EEA (n=10076 microorganisms)



εικόνα 30: τα συχνότερα απομονωθέντα μικρόβια υπεύθυνα για HAIs στις χώρες της Ε.Ε το 2012 . Στοιχεία από ECDC (PSS 2011-2012).

Most frequently isolated microorganisms in HAIs (all HAI types) in acute care hospitals in Greece (n=564 microorganisms)



εικόνα 31: οι συχνότερα απομονωθέντες μικροοργανισμοί, υπεύθυνοι για HAIs το 2012 στην Ελλάδα . Στοιχεία από ECDC (PSS 2011-2012). Συμφωνα με τα αδημοσιεύτα στοιχεία του PSS 2016-2017, το 2016 η σειρά έχει αλλάξει: 1) Acinetobacter spp 2) Klebsiella spp 3) P.aeruginosa 4) E.coli και 5) S.aureus.

Τα ανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια λόγω της ιδιαίτερης δομής του κυτταρικού τοιχώματός τους και των αμυντικών μηχανισμών που διαθέτουν, όπως πχ β-λακταμάσες και αντλίες εκροής, καθώς και της ικανότητάς τους να αποκτούν γονίδια αντοχής, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν υπάρχουν νέα φάρμακα για την αντιμετώπισή τους, δεν είναι απορίας άξιο το ότι συνιστούν συχνό αίτιο των νοσοκομειακών λοιμώξεων . Δεδομένα από τις Η.Π.Α. και την Ε.Ε. δείχνουν ότι τα gram-αρνητικά βακτήρια ευθύνονται για >30% των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Κυριαρχούν στις περιπτώσεις πνευμονίας και ειδικότερα της πνευμονίας συνδεδεμένης με αναπνευστήρα (VAP) και στις λοιμώξεις ουροποιητικού (UTIs). Στις λοιμώξεις που εμφανίζονται στις ΜΕΘ, τα gram- αρνητικά ευθύνονται σε ποσοστό 60-70% [209,210] . Από τους gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς που ευθύνονται για τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις , η οικογένεια των εντεροβακτηριακών είναι εκείνη που απομονώνεται ολοένα και συχνότερα. Συγκεκριμένα, η *E.coli* είναι το συχνότερο αίτιο των νοσοκομειακών λοιμώξεων ουροποιητικού ακολουθούμενη από *Klebsiella spp.* Τα *Klebsiella spp* και *Enterobacter spp* είναι συχνά αίτια νοσοκομειακής πνευμονίας. Η παγκόσμια πανδημία της αντοχής των εντεροβακτηριακών τις τελευταίες 2 δεκαετίες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εμφάνιση και τη διάδοση των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBLs) και των καρβαπενεμασών σε αυτούς τους οργανισμούς. [203,211,212,213] .Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα περισσότερα είδη στην ομάδα των παθογόνων ESKAPE, κύριων υπευθύνων των HAIs, ανήκουν στα gram-αρνητικά . Στην Ελλάδα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα του εθνικού σχεδίου δράσης «Προκρούστης» , το 51,8% των παθογόνων που απομονώνονται από ασθενείς με νοσοκομειακή λοίμωξη αφορά στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες gram-αρνητικά *Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp* και *P.aeruginosa* .

3.2 λοιμώξεις κοινότητας από gram-αρνητικά

Ανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια υπάρχουν όχι μόνο στο νοσοκομείο αλλά και στην κοινότητα. Σύμφωνα με στοιχεία του WHONET το 2016 στην Ελλάδα, το 43,3 % των *E.coli* που προκαλούν λοιμώξεις ουροποιητικού της κοινότητας είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, το 24,5% στην κοτριμοξαζόλη ,το 16,7 % στη σιπροφλοξασίνη , το 7,65% στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς και το 0,35% στην ιμιπενέμη.

Οι λοιμώξεις κοινότητας που προκαλούνται από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Ορισμένες πολυκεντρικές μελέτες, κυρίως σε χώρες της Ν.Α. Ασίας και της Λατινικής Αμερικής, δείχνουν ότι τα ποσοστά των λοιμώξεων κοινότητας που οφείλονται σε ανθεκτικά gram-αρνητικά είναι εξίσου υψηλά με αυτά των νοσοκομείων. Σε αρκετές χώρες, ως και το 30-40% των λοιμώξεων κοινότητας οφείλεται σε ανθεκτικά στελέχη [214-217]. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά (κυρίως *E.coli*) που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, όπως είναι τα ένζυμα CTX-M (και κυρίως CTX-M-15), έχουν προκύψει ως σημαντική αιτία λοιμώξεων κοινότητας (ουρολοιμώξεις, βακτηριαιμίες, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις) [238]. Η επικράτησή τους γίνεται μέσω επιτυχημένων κλώνων. Ειδικότερα για το *E.coli* είναι ο κλώνος ST131 που έχει ευρέως διαδοθεί σε παγκόσμια κλίμακα [16,218-228]. Πρόσφατες αναφορές, επίσης, έχουν περιγράψει τα ESBL-θετικά *E.coli* και *K.pneumoniae* ως αυξανόμενη αιτία βακτηριακών κοινότητας [229,230,231]. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών στον άνθρωπο και στη ζωοτροφία και η φαρμακευτική ρύπανση οδήγησαν σε περιβάλλοντα και ανθρώπους με αποικισμό ανθεκτικών στελεχών. Στο Πακιστάν, μελέτη που έγινε σε νοσηλεύομενους ασθενείς κατά τη στιγμή της εισαγωγής τους, έδειξε ότι το ποσοστό αποικισμού τους σε ανθεκτικά στελέχη (τα οποία δεν συνδέονταν κλινικά με την αιτία νοσηλείας) ανερχόταν στο 95%, και συγκεκριμένα το 20% αυτών ήταν φορείς της NDM-1. Επίσης, υπολογίζεται ότι στην Ινδία οι υγιείς φορείς καρβαπενεμασών στο γενικό πληθυσμό ανέρχονται στο 7,5%. Σε άλλη μελέτη στην Ινδία, σε εγκυμονούσες με ασυμπτωματική βακτηριουρία το ποσοστό των ανθεκτικών *E.coli* ήταν 94%, εκ των οποίων το 4,92% ήταν πολυανθεκτικά (MDR) [232,233]. Η μεταφορά MDR βακτηρίων τόσο μέσω της άμεσης επαφής με αποικισμένα άτομα, ζώα και χώρους όσο και μέσω της διατροφικής αλυσίδας έχει εκφραστεί στην αυξανόμενη ανάδυση ανθεκτικών λοιμώξεων κοινότητας [208,234,235,236]. Στην αύξηση των λοιμώξεων κοινότητας από MDR συμβάλλουν και τα διεθνή ταξίδια. Υπολογίζεται ότι περίπου 80 εκατ. άνθρωποι ταξιδεύουν προς τις LMICs ετησίως. Σημαντική πιθανότητα όχι μόνο να αποικιστούν, αλλά και να νοσήσουν από ανθεκτικά στελέχη, έχουν άνθρωποι που ταξίδεψαν σε περιοχές που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά αντοχής, όπως Ν.Α. Ασία και Αφρική [239,240,241].

3.3 δεδομένα αντοχής των gram-αρνητικών στην Ελλάδα και στην Ευρώπη

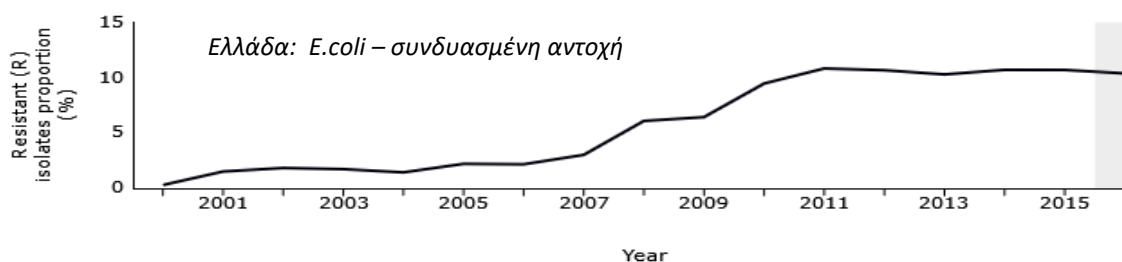
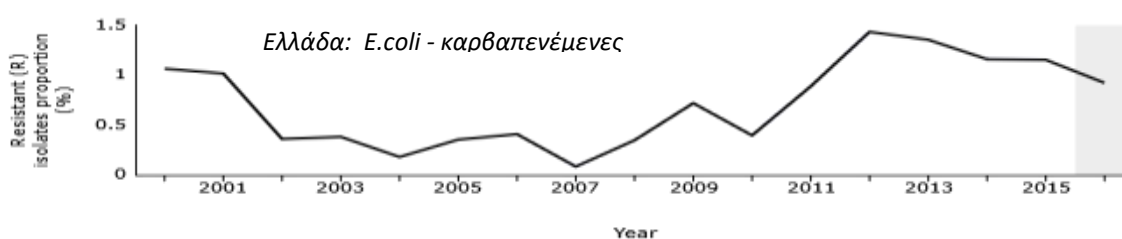
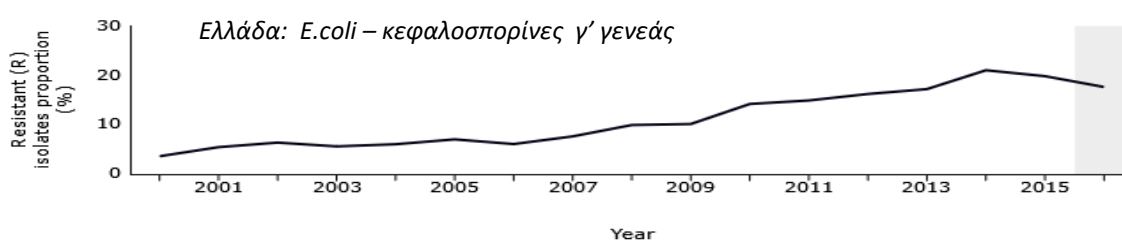
Η αντοχή των σημαντικότερων gram-αρνητικών παθογόνων που προκαλούν τόσο λοιμώξεις κοινότητας (community acquired infections, CAIs) όσο και λοιμώξεις σχετιζόμενες με μονάδες παροχής υπηρεσιών υγείας (healthcare acquired infections, HAIs) αυξάνεται αδρανοποιώντας τα αντιβιοτικά που διαθέτουμε για την αντιμετώπισή τους. Οι λοιμώξεις από ανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη θνησιμότητα, επιπλέον ημέρες νοσηλείας και υψηλό οικονομικό κόστος σε σχέση με τις λοιμώξεις που προκαλούνται από τα αντίστοιχα ευαίσθητα παθογόνα [16,20,21,198,280].

Όσον αφορά στην κοινότητα, μας απασχολεί η *E.coli*, που είναι το συχνότερο αίτιο λοιμώξεων ουροποιητικού, καθώς η αντοχή της στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενεάς αυξάνεται συνεχώς, ενώ εμφανίζει και υψηλά επίπεδα αντοχής στις φθοριοκινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες. Όσον αφορά στις νοσοκομειακές λοιμώξεις μας απασχολεί η διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες gram-αρνητικών βακτηρίων, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι το *A.baumannii*, η *P.aeruginosa* και τα εντεροβακτηριακά CRE (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*), με κύριο εκπρόσωπο την *K.pneumoniae*.

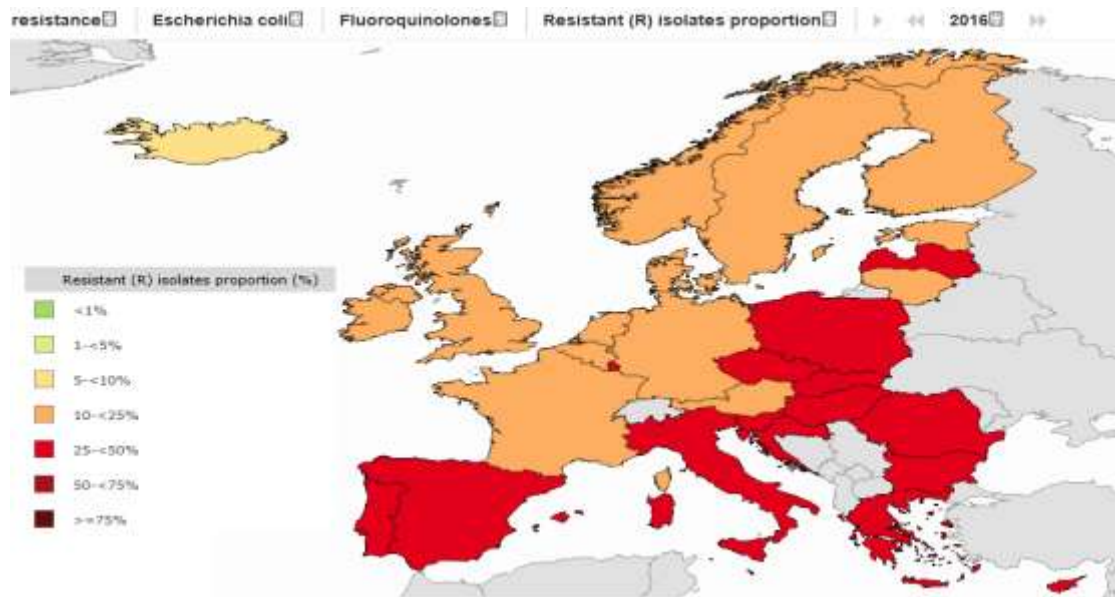
Στο ελλαδικό χώρο, τα συχνότερα απομονωθέντα βακτηριακά αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων είναι το *Acinetobacter*, η *Klebsiella* και η *Pseudomonas*, ενώ >50% των απομονωθέντων στελεχών είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, ιδιαίτερα όσον αφορά στα δύο πρώτα παθογόνα, σύμφωνα με στοιχεία του «Προκρούστη».

Το Νοέμβριο του 2017 ανακοινώθηκαν από το ECDC δεδομένα μικροβιακής αντοχής κλινικά σημαντικών στελεχών για το διάστημα 2013-2016. Συγκεκριμένα, το 2016, στις χώρες EU/EEA, ο μέσος όρος αντοχής της *E.coli* στις αμινοπενικιλίνες ήταν 57,4% (χαμηλότερο ποσοστό στη Φινλανδία με 35,8% και υψηλότερο στη Βουλγαρία με 78,0%), στις φθοριοκινολόνες ήταν 21,0% (χαμηλότερο ποσοστό στην Ισλανδία με 9,6% και υψηλότερο στην Κύπρο με 47,0%) και στις αμινογλυκοσίδες ήταν 10,4% (χαμηλότερο στην Ισλανδία με 3,6%, υψηλότερο στη Βουλγαρία με 34,8%). Η αντοχή στις φθοριοκινολόνες παρουσίασε μικρή πτώση κατά την 4ετία αυτή. Αντιθέτως, στο ίδιο διάστημα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της αντοχής της

E.coli στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς , από 11,9% το 2012 στο 12,4% το 2016. Από αυτά ,το 88,4% ήταν ESBL-θετικά στελέχη. Η αντοχή της *E.coli* στις καρβαπενέμες είναι σχετικά σπάνια στην Ευρώπη με μέσο όρο εμφάνισης <0,1% . Είκοσι δύο χώρες ανέφεραν αντοχή<0,1% το 2016,με εξαίρεση την Ελλάδα και τη Ρουμανία, οι οποίες εμφάνισαν ποσοστό αντοχής 0,9 % και 1,0% αντίστοιχα. Αντίσταση στην κολιστίνη αναφέρθηκε σποραδικά .Ιδιαίτερα ανησυχητική είναι η αυξητική τάση στη συνδυασμένη αντοχή της *E.coli* σε φθοριοκινολόνες , κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και αμινογλυκοσίδες με μεσο ευρωπαϊκό όρο 4,8% (χαμηλότερο ποσοστό στην Ισλανδία με 1,1% και υψηλότερο στη Βουλγαρία με 22,1%) (διαγράμματα 1-4, εικόνες 32-34) [196].

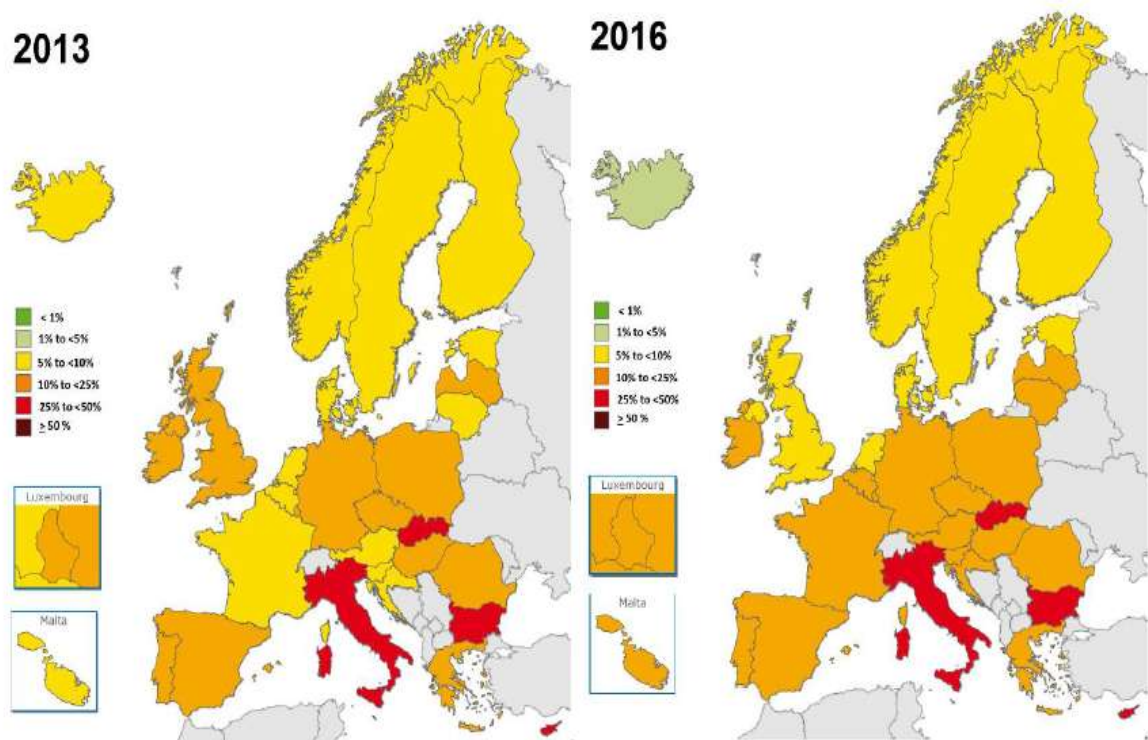


διαγράμματα 1-4: Η αντοχή της *E.coli* το διάστημα 2000 -2016 στην Ελλάδα σε: 1) φθοριοκινολόνες 2) κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενεάς 3) καρβαπενέμες 4) συνδυασμένη αντοχή

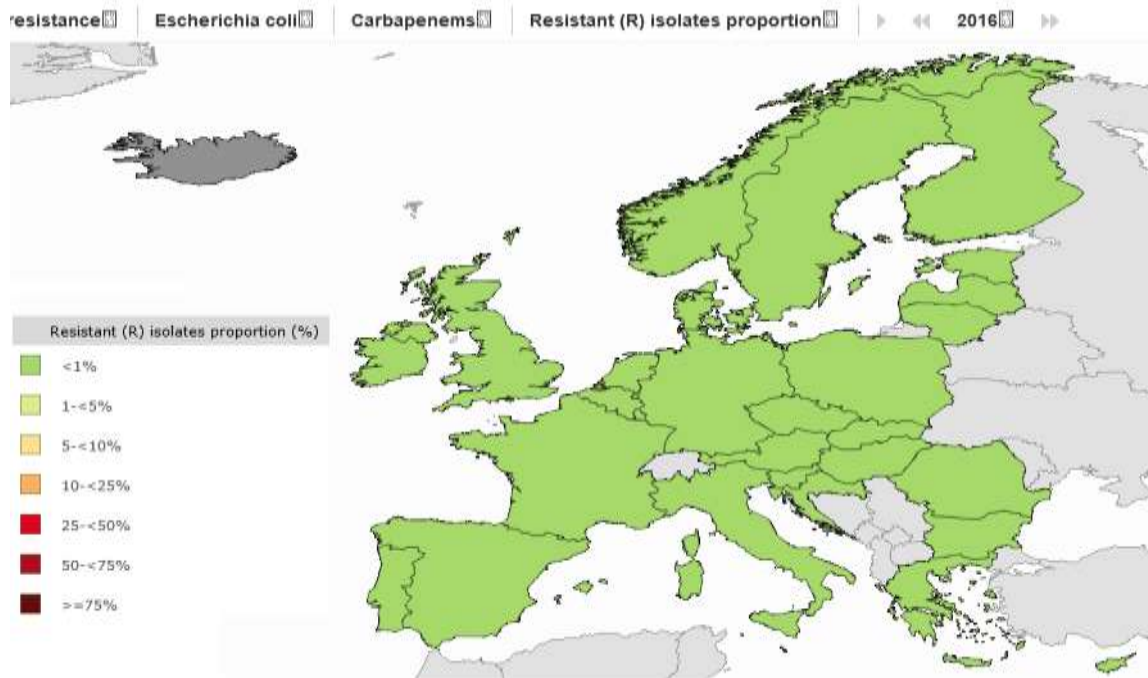


εικόνα 32: επίπεδα αντοχής της *E.coli* στις φθοριοκινολόνες το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 32,1 %. Η Ελλάδα κατέχει την 8^η υψηλότερη θέση. Στοιχεία από ECDC.

Figure 4. *Escherichia coli*: percentage of invasive isolates with resistance to third-generation cephalosporins, EU/EEA, 2013 (left), 2016 (right)

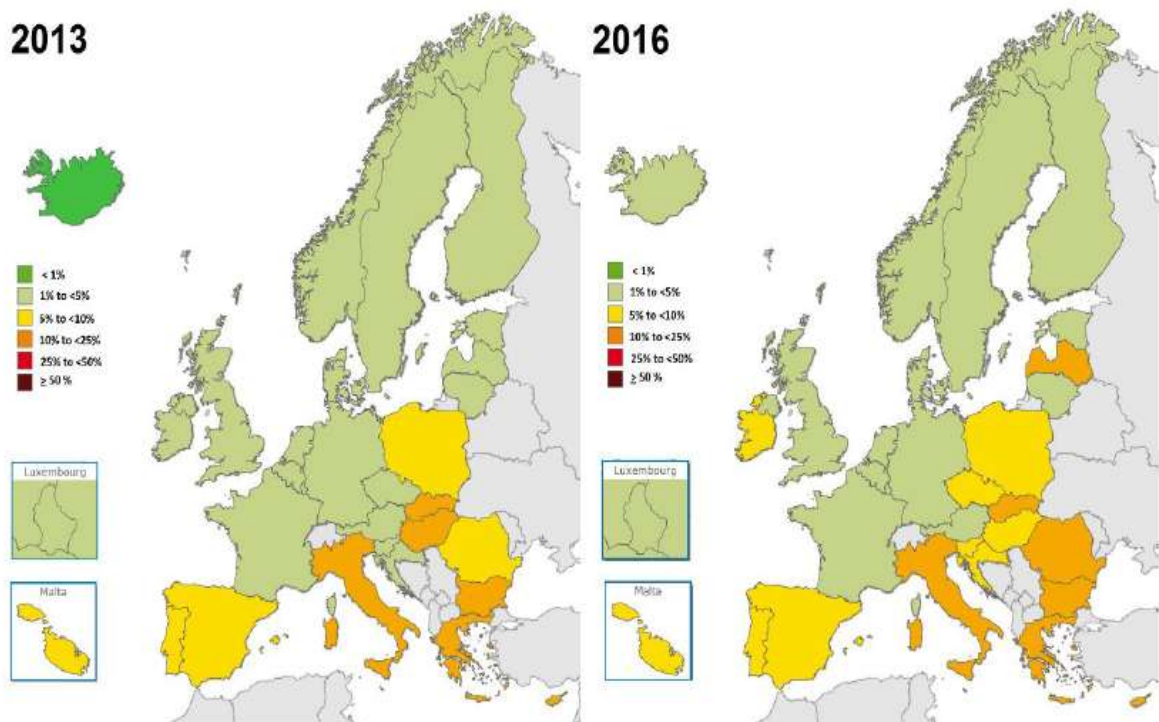


εικόνα 33: επίπεδα αντοχής της *E.coli* στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 17,6 % (μικρή πτώση από το 2015 που ήταν στο 19,8 %) . Κατέχει την 7^η υψηλότερη θέση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 88,4% της αντοχής στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς αφορούσε σε ESBL-θετικά στελέχη. Στοιχεία από ECDC.



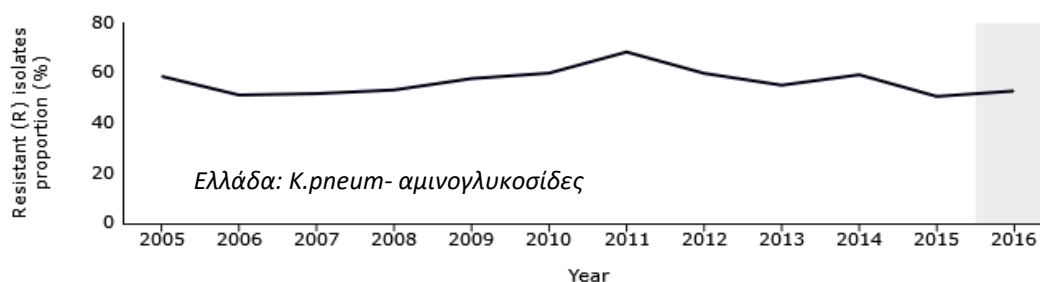
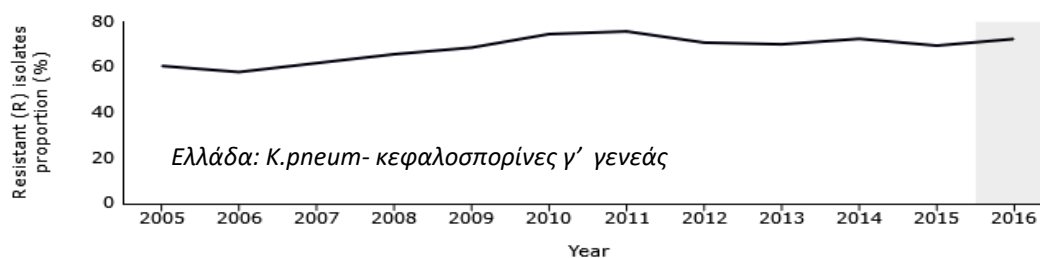
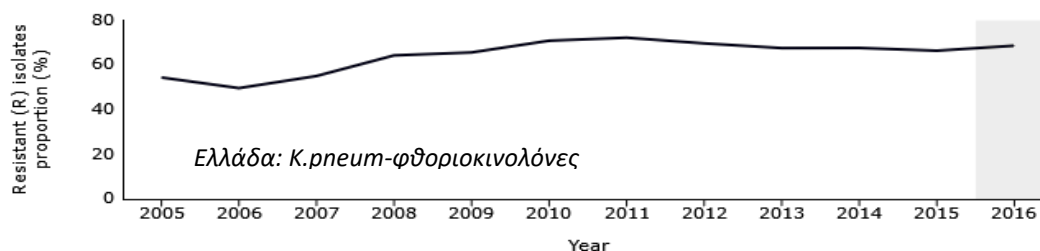
εικόνα 34a: επίπεδα αντοχής της E.coli στις καρβαπενέμες το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 0,9 %. Είναι μειωμένο συγκριτικά με αυτό του 2012 και του 2015 ,αλλά το 2^ο υψηλότερο στην Ευρώπη μετά τη Ρουμανία. Στοιχεία από ECDC.

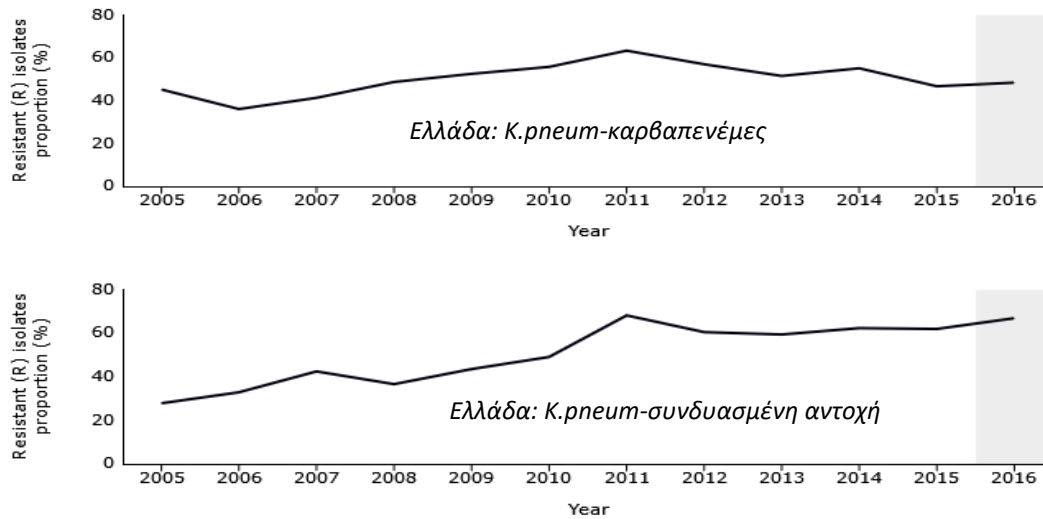
Figure 5. *Escherichia coli*: percentage of invasive isolates with combined resistance to third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides, EU/EEA, 2013 (left), 2016 (right)



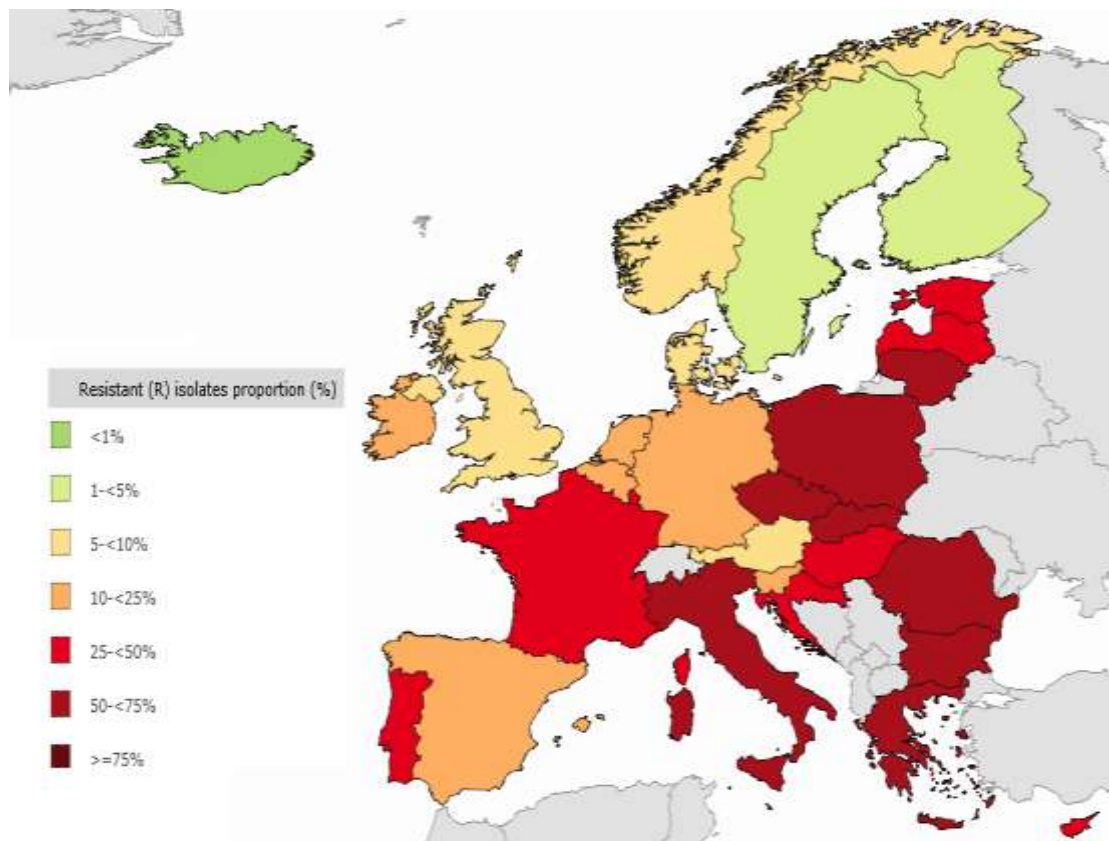
εικόνα 34b: επίπεδα συνδυασμένης αντοχής της E.coli το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 10,4% κατέχοντας την 6^η υψηλότερη θέση στην Ευρώπη. Στοιχεία από ECDC.

Το 2016, η αντοχή της *K.pneumoniae* σημείωσε μικρή πτώση σε σχέση με το 2015, με εξαίρεση την αντοχή στις καρβαπενέμες που δεν είχε αξιοσημείωτες μεταβολές. Συγκεκριμένα, οι ευρωπαϊκοί μ.ο. αντοχής της *K.pneumoniae* είναι: 25,7% στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς (μηδενικό ποσοστό στην Ισλανδία και το υψηλότερο στην Ελλάδα με 72,5%), 24,6% στις φθοριοκινολόνες (μηδενικό ποσοστό στην Ισλανδία και το υψηλότερο στην Ελλάδα με 68,6%), 19% στις αμινογλυκοσίδες (μηδενικό ποσοστό στην Ισλανδία και το υψηλότερο στη Βουλγαρία με 64,4%. Η Ελλάδα κατέχει την 5^η υψηλότερη θέση). Αξίζει να σημειωθεί ότι το 87,1% της αντοχής στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς αφορούσε σε ESBL-θετικά στελέχη. Η αντοχή της *K.pneumoniae* στις καρβαπενέμες παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα (6,1%), με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρουσιάζεται στην Ελλάδα (66,9%). Όσον αφορά στη συνδυασμένη αντοχή σε φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς και αμινογλυκοσίδες παρατηρήθηκε μικρή πτώση με το ευρωπαϊκό μέσο όρο να είναι 15,8% (μηδενικό ποσοστό στην Ισλανδία και το υψηλότερο στη Σλοβακία με 55,7%. Η Ελλάδα κατέχει την 4^η υψηλότερη θέση). (διαγράμματα 5-9, εικόνα 35).



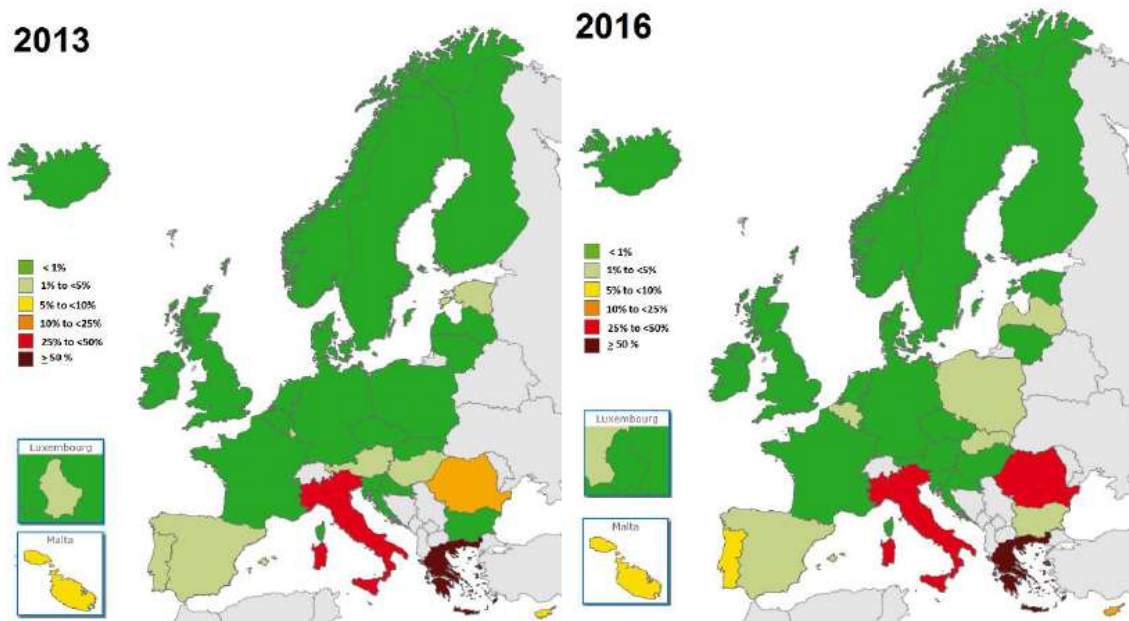


Διαγράμματα 5-9 Αντοχή της Κ.ρνευμοπίαε το διάστημα 2005-2016 στην Ελλάδα σε: 1) φθοριοκινολόνες 2) κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενεάς 3) αμινογλυκοσίδες 4) καρβαπενέμες 5) συνδυασμένη αντοχή .Στην Ελλάδα τα ποσοστά εξακολουθούν να είναι από τα υψηλότερα στην Ευρώπη.



εικόνα 35α: αντοχή Κ.ρνευμοπίαε σε κεφαλοσπορίνες γ γενεάς το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 72,5% κατέχοντας την πρώτη θέση στην Ευρώπη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 87,1% της αντοχής στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς αφορούσε σε ESBL-θετικά στελέχη.

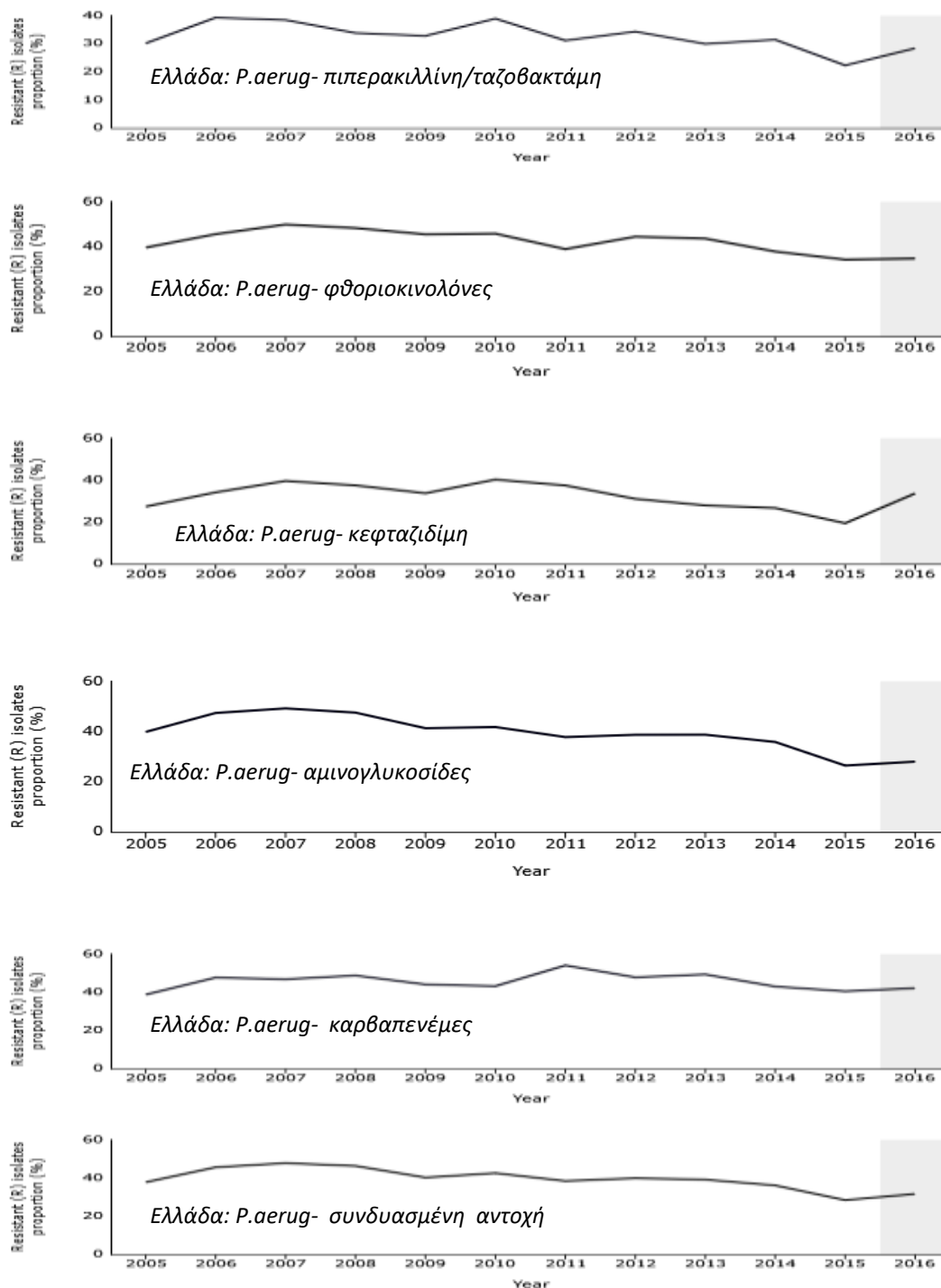
Figure 2. *Klebsiella pneumoniae*: percentage of invasive isolates with resistance to carbapenems, EU/EEA, 2013 (left), 2016 (right)



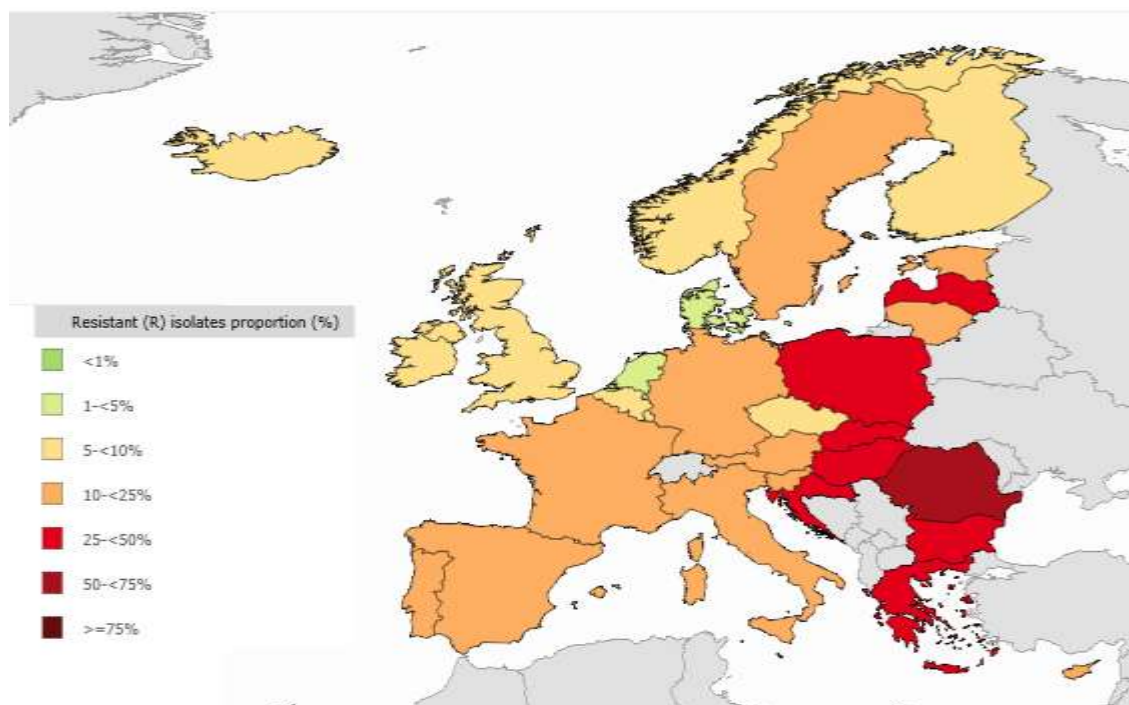
εικόνα 35β: αντοχή *K. pneumoniae* σε καρβαπενέμες το 2016. Το ποσοστό στην Ελλάδα είναι 66,9% κατέχοντας την πρώτη θέση στην Ευρώπη.

Σύμφωνα με το ECDC, το 2016 στην Ευρώπη, η αντοχή της ψευδομονάδας στην κεφταζιδίμη παρουσίασε αυξητική τάση (ποσοστό 13%), ενώ εμφάνισε μικρή μείωση όσον αφορά στις φθοριοκινολόνες (15%), τις καρβαπενέμες (15%) και τις αμινογλυκοσίδες (10%). Μικρή πτώση, επίσης, παρατηρήθηκε και στη συνδυασμένη αντοχή σε 3 ή περισσότερα αντιμικροβιακά. Παρέμεινε στα ίδια επίπεδα όσον αφορά στο συνδυασμό πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη (16,3%). Στην Ελλάδα, αν και αποτελεί μία από τις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής, σημειώθηκε γενικότερη πτώση την τετραετία 2013- 2016, με εξαίρεση κι εδώ την αντοχή στην κεφταζιδίμη, που εμφάνισε αύξηση. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα, η αντοχή της *P.aeruginosa* ανέρχεται: στο 28,3% στην πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη καταλαμβάνοντας την 6^η θέση (μηδενικό ποσοστό στην Ισλανδία και το υψηλότερο στη Ρουμανία με 48,8%), στο 34,6% όσον αφορά στις φθοριοκινολόνες κατέχοντας την 6^η θέση, στο 28% στις αμινογλυκοσίδες (5^η θέση), στο 42,1% στις καρβαπενέμες καταλαμβάνοντας τη 4^η θέση (χαμηλότερο ποσοστό στη Δανία με 2,4% και το υψηλότερο στη Ρουμανία με 51,6%) και στο 31,6% όσον αφορά στη συνδυασμένη αντοχή κατέχοντας την 5^η θέση. Η αντοχή στην κεφταζιδίμη, όπως ειπώθηκε,

εμφάνισε μικρή αύξηση με την Ελλάδα να κατέχει την 3^η θέση με ποσοστό 33,6%. Η Ρουμανία είναι η χώρα που παρουσιάζει συνολικά το υψηλότερο ποσοστό αντοχής της ψευδομονάδας. (διαγράμματα 10-15, εικόνα 36).

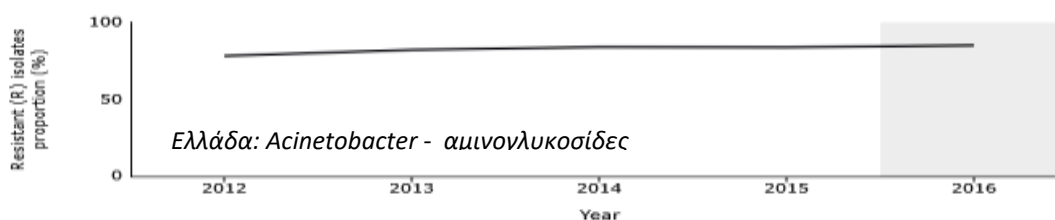
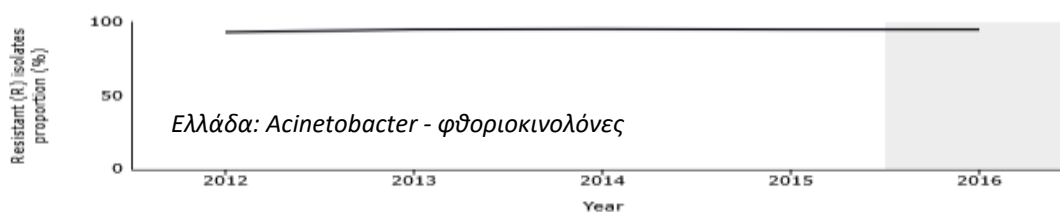


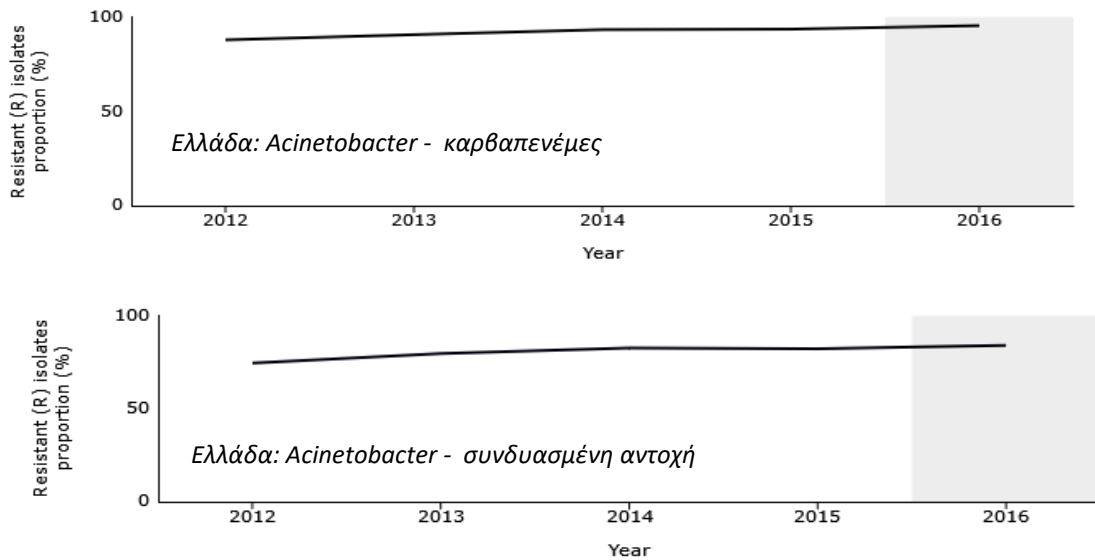
Διαγράμματα 10-15: Αντοχή της *P.aeruginosa* το διάστημα 2005-2016 στην Ελλάδα σε: 1)πιπερακιλλίνη/ ταζοβακτάμη 2)φθοροκινολόνες 3) κεφταζιδίμη 4) αμινογλυκοσίδες 5) καρβαπενέμες 6) συνδυασμένη αντοχή. Καταγράφηκε πτωτική τάση, με εξαίρεση την αντοχή στην κεφταζιδίμη.



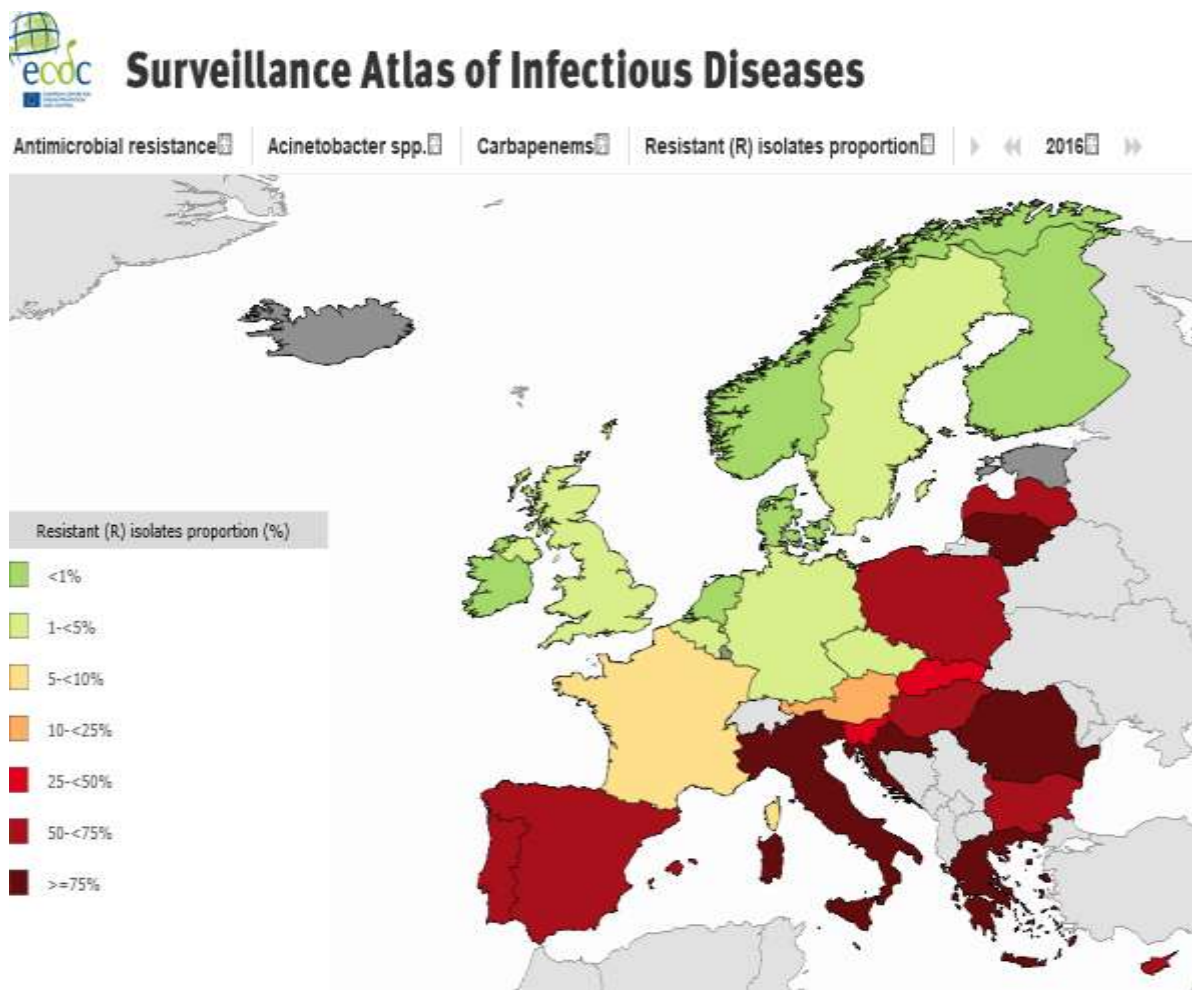
εικόνα 36 :αντοχή της *P.aeruginosa* στις καρβαπενέμες το 2016. Στην Ελλάδα το ποσοστό είναι 42,1%. Σημειώθηκε μείωση σε σχέση με το 2015, όμως εξακολουθεί να βρίσκεται μεταξύ των υψηλότερων. Το υψηλότερο ποσοστό εμφανίζεται στη Ρουμανία (51,7%).

Η αντοχή των *Acinetobacter* spp στα διάφορα αντιβιοτικά εμφανίζει ευρεία διακύμανση μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών με υψηλά ποσοστά να παρατηρούνται στις χώρες της Βαλτικής, της Νότιας και της Νοτιοανατολικής Ευρώπης. Η Ελλάδα δήλωσε το μεγαλύτερο αριθμό απομονωθέντων στελεχών με αντοχή στις φθοροκινολόνες, στις αμινογλυκοσίδες, στις καρβαπενέμες και στις πολυμυξίνες (διαγράμματα 16-19, εικόνα 37)



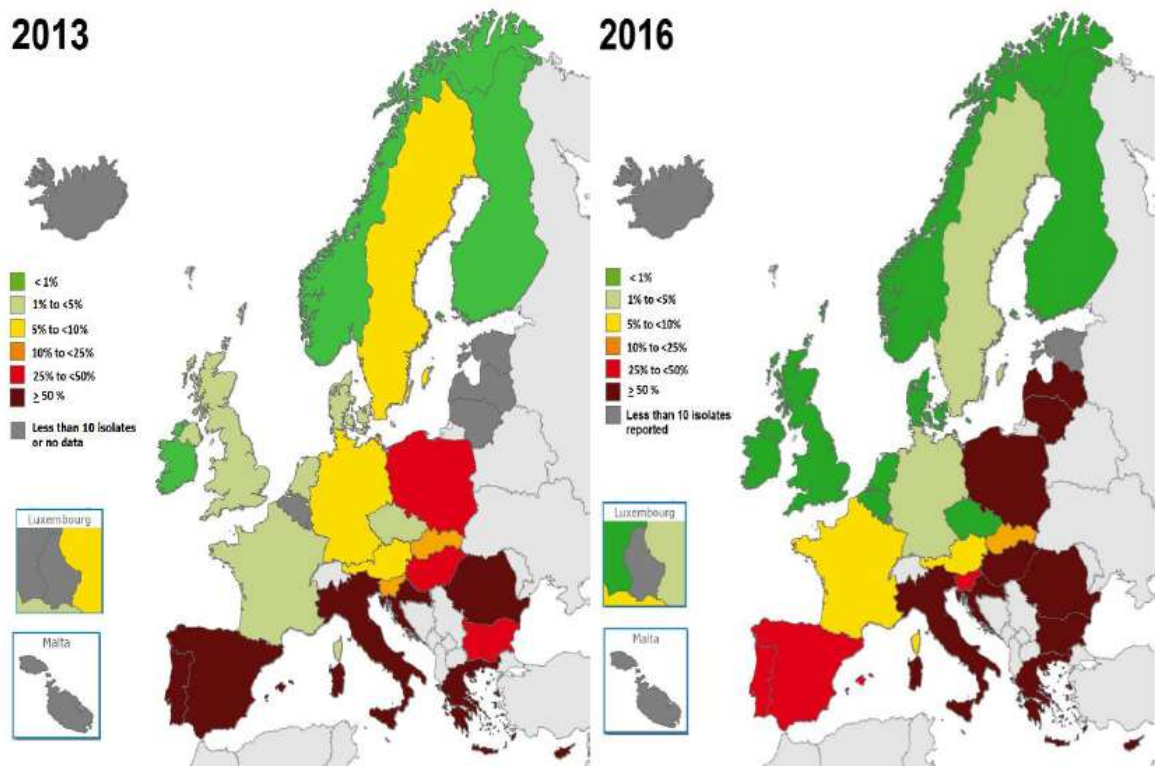


πίνακας 5: Στην Ελλάδα απομονώθηκαν τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter* spp το διάστημα 2013-2016 , τα οποία εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά αντοχής σε φθοριοκινολόνες, αμινογλυκοσίδες, καρβαπενέμες και πολυμυξίνες.



εικόνα 37α : αντοχή *Acinetobacter* spp στις καρβαπενέμες το 2016

Figure 6. *Acinetobacter* species: percentage of invasive isolates with combined resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides and carbapenems, EU/EEA, 2013 (left), 2016 (right)



εικόνα 37β: συνδυασμένη αντοχή *Acinetobacter* spp στις φθοριοκινολόνες, τις καρβαπενέμες και τις αμινογλυκοσίδες το 2016.

Στην Ελλάδα, το ΚΕΕΛΠΝΟ έχει αρχίσει από το 2010 πρόγραμμα για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής ,το εθνικό σχέδιο δράσης «Προκρούστης», που αυτή την περίοδο βρίσκεται στην τρίτη φάση του (Ιούλιος 2014- σήμερα) . Στο σχέδιο αυτό γίνεται καταγραφή της επίπτωσης των λοιμώξεων στα νοσοκομεία που οφείλονται σε πολυανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια (*A.baumannii* , *P.aeruginosa*, *Klebsiella* spp). Στην τρίτη περίοδο του σχεδίου προστέθηκαν στην επιτήρηση ο MRSA και οι VRE. Τα δεδομένα του σχεδίου «Προκρούστης» αφορούν επίπτωση, και όχι επιπολασμό, και συνεπώς αντανακλούν το πραγματικό βάρος της μικροβιακής αντοχής για το σύστημα υγείας. Δεν είναι όμως ακόμη προσβάσιμα [242]. Σύμφωνα, όμως, με πρόσφατες ανακοινώσεις σε συνέδρια , στην Ελλάδα το 2015 η μέση μηνιαία επίπτωση βακτηριαιμιών από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια ανά 1000 ημέρες νοσηλείας είναι 0.108 για το *A.baumannii*, 0.094 για την *Klebsiella* spp και 0.045 για την *P.aeruginosa*. Το 2015 καταγράφησαν 2139

βακτηριαιμίες από αυτά τα 3 αρνητικά κατά Gram βακτήρια (59% αυτών στις ΜΕΘ και 41% στα λοιπά κλινικά τμήματα) , με θνητότητα στις 28 ημέρες νοσηλείας 44% , πέθαιναν δηλαδή 941 ασθενείς. Το 2016 , η μέση επίπτωση βακτηριαμιών ανά 1000 μέρες νοσηλείας είναι 0,107 για το *A.baumannii*, 0.103 για την *Klebsiella spp* και 0.044 για την *P.aeruginosa*, 0,024 για τον MRSA και 0,013 για τον VRE.

Όλα τα ανθεκτικά μικρόβια που απομονώνονται στα ελληνικά νοσοκομεία καταγράφονται από το Ελληνικό Σύστημα Καταγραφής της Μικροβιακής Αντοχής (www.mednet.gr/whonet). Πρόκειται για δεδομένα επιπολασμού και αφορούν ποσοστά αντοχής κάθε μικροβίου. Τα δεδομένα επικαιροποιούνται ανά 6μηνο. Το δίκτυο WHONET λειτουργεί από το 2000 , βασίζεται στη συλλογή και ανάλυση των δεδομένων ρουτίνας των μικροβιολογικών εργαστηρίων και χρησιμοποιεί το λογισμικό σύστημα WHONET του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Διαμορφώνεται έτσι μια πολυκεντρική βάση δεδομένων ,τα οποία είναι προσβάσιμα στο κοινό.

Η Ελλάδα είναι μια χώρα με σύνθετη επιδημιολογία ως προς τη διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών. Φαίνεται να επικρατούν τα στελέχη που φέρουν μηχανισμούς αντοχής για τα νεότερα και πιο αποτελεσματικά αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται στα νοσοκομεία. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να διασπείρονται κλωνικά μέσα στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Klebsiella spp: Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στην *Klebsiella spp*, το φαινόμενο αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη συνεχιζόμενη επιδημία στη χώρα μας στελεχών που φέρουν καρβαπενεμάσες. Από το 2003 ως το 2008, επικρατούσα καρβαπενεμάση ήταν η VIM-1 (κλώνοι ST147,ST36,ST383) [243,244]. Συνολικά ,η απομόνωση στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής VIM αυξήθηκε από 1% το 2001 στο 50% το 2006 για τις ΜΕΘ, όπως αποτυπώθηκε στα στοιχεία του WHONET. Από το 2007 ως το 2016 επικρατούσα καρβαπενεμάση ήταν η KPC-2 (επικρατών κλώνος ST258), ενώ το ίδιο διάστημα συνήθης ήταν και η απομόνωση στελεχών που παρήγαγαν VIM και KPC μαζί και αντιστοιχούσαν στον κλώνο ST147 [245-249].Την ίδια περίοδο καταγράφονται και επιδημίες από στελέχη ανθεκτικά στην κολιστίνη [250,251,275]. Η παραγωγή KPC-2 στα στελέχη *K.pneumoniae* μολονότι αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα στον ελλαδικό χώρο αποτελεί τον επικρατέστερο μηχανισμό αντοχής των στελεχών

K.pneumoniae ,που απομονώνονται ως αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων [249]. Επί του παρόντος, η παρουσία KPC είναι πανω από 50% στα περισσότερα νοσοκομεία. Το 2011-2013 υπήρξαν 2 μονοκλωνικές επιδημίες στελεχών με παραγωγή NDM-1 και CTX-M-15 (κλώνος ST11) σε νοσοκομείο των Ιωαννίνων και το 2013 μονοκλωνική επιδημία με παραγωγή OXA-48 και CTX-M-15 (κλώνος ST11) [252-254].Από το 2013 και μετά ,αρχίζουν να κάνουν την εμφάνισή τους οι NDM και οι OXA-48 , χωρίς ακόμα να έχουν δημιουργήσει μεγάλο πρόβλημα.Κλώνος υψηλού κινδύνου είναι ο ST258, με παγκόσμια διασπορά , έχει φαινότυπο εκτεταμένης αντοχής (XDR) και ικανότητα παρατεταμένου αποικισμού με μέσο όρο 6 μήνες και προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις.Προσφάτως για πρώτη φορά στην Ελλάδα , σε μονοκλωνική επιδημία (ST101) σε ΜΕΘ των Σερρών αναδύθηκε κι άλλος μηχανισμός αντοχής σε στελέχη *K.pneumoniae*, που συναντάται σπανίως, ο οποίος προσδίδει αντοχή στις καρβαπενέμες μέσω της διαταραγμένης έκφρασης της πορίνης *OmpK35* και της παραγωγής παραλλαγμένης *OmpK36* ,σε συνδυασμό με την παραγωγή CTX-M-15 [276].

A.baumannii : Αντίστοιχα, η αύξηση της συχνότητας απομόνωσης του *Acinetobacter baumannii* οφείλεται στο συνδυασμό της επίκτητης β-λακταμάσης OXA-51 με τις επίκτητες OXA-58 και πιο πρόσφατα την OXA-23, που παρέχουν υψηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες και σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η διαχρονική εναλλαγή κλώνων *Acinetobacter* αποτελεί, επίσης, μια καθοριστική παράμετρο στην επιδημιολογία του μικροοργανισμού. Σε διεθνές επίπεδο ο αριθμός γενετικών κλώνων που επικρατούν στις ΜΕΘ είναι πολύ μικρός. Πιο συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια επικρατούν παγκοσμίως οι διεθνείς κλώνοι I και II, με τον κλώνο II να εκτοπίζει σταδιακά τον κλώνο I και τα περισσότερα στελέχη *A. baumannii* από τις ΜΕΘ πλέον να ανήκουν στον κλώνο II [255-258]. Προσφάτως απομονώθηκε ,για πρώτη φορά στην Ελλάδα και στα Βαλκάνια, *A.baumannii* που φέρει NDM-1 και OXA-23 [259].

P. aeruginosa : Σχετικά με την *P. aeruginosa* στην Ελλάδα, φαίνεται πως ο μηχανισμός αντοχής στις αντιψευδομοναδικές β-λακτάμες,που αφορά στην παραγωγή της καρβαπενεμάσης VIM, παραμένει σταθερός την τελευταία δεκαετία [260-264]. Η πρώτη αναφορά αφορούσε μια νοσοκομειακή έξαρση κρουσμάτων το

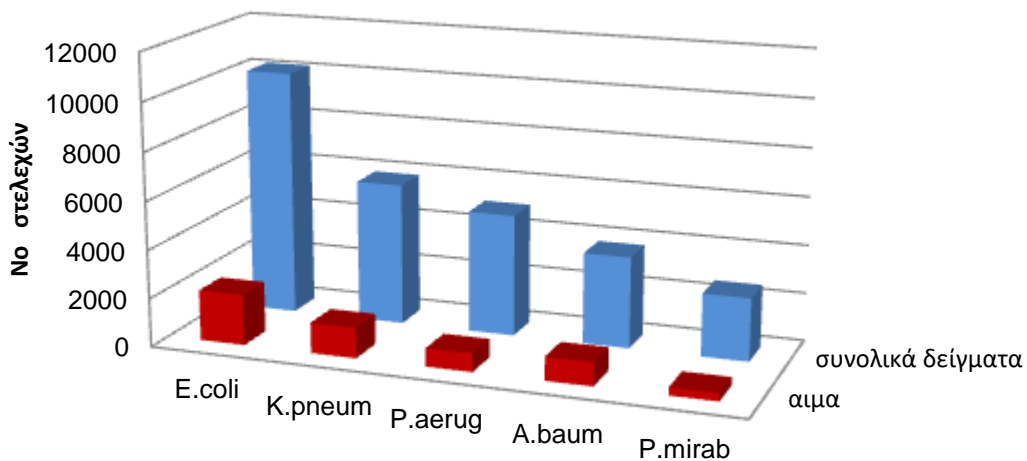
1997 [262]. Τα ανθεκτικά στελέχη φαίνονται να επιλέγονται στις ΜΕΘ και μέσω της φορέας των ασθενών να μεταφέρονται και στις υπόλοιπες κλινικές. Η *P. aeruginosa* βρίσκεται παντού ιδιαίτερα στα υγρά περιβάλλοντα (πολλές φορές στις βρύσες και τις αποχετεύσεις στις ΜΕΘ). Η *P. aeruginosa* εμφανίζει αρκετά μεγάλη γενετική ετερογένεια και δεν υπάρχουν πολλές αναφορές επικρατούντων κλώνων μεταξύ των χωρών.

άλλα είδη gram- αρνητικών: Τέλος, στη χώρα μας έχουν καταγραφεί αυξημένα κρούσματα από στελέχη *P.mirabilis* που παράγουν VIM (Σέρρες 2004-2005) και στη συνέχεια διασπορά στην ευρύτερη περιοχή αυτού του κλώνου προκαλώντας ουρολοιμώξεις κοινότητας [265,272], ενώ κατεγράφησαν και μονοκλωνικές επιδημίες από στελέχη *P.stuartii* με παραγωγή VIM [266,267]. Το Νοέμβριο του 2001 απομονώθηκε στην Ελλάδα για πρώτη φορά στέλεχος *E.coli* με μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες, το οποίο παρήγαγε VIM .Αποτέλεσε την πρώτη περίπτωση στην Ευρώπη ανθεκτικού στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακού [268]. Λίγο αργότερα εντοπίστηκε και σε νοσοκομείο της Κρήτης [269].Η παραγωγή VIM έχει, επίσης, περιγραφεί σε *E. cloacae* , *E.aerogenes* , *M. morgani* [270-273], ενώ έχουν περιγραφεί κρούσματα από *E.coli* που παράγει KPC- 2 [274].

Η αυξημένη χρήση της κολιστίνης στα νοσοκομεία για τη θεραπεία των πολυανθεκτικών λοιμώξεων, ευνοεί την επικράτηση βακτηριακών ειδών με εγγενή αντοχή στην κολιστίνη, όπως *P.mirabilis*, γεγονός που οδηγεί σε σταθερή αύξηση απομόνωσής του από 3,1% το 2006 σε 4,5% το 2016 (WHONET).Η ευρεία χρήση της κολιστίνης ακολουθήθηκε από αυξανόμενη απομόνωση ανθεκτικών σε αυτήν στελεχών *K.pneumoniae* και σύμφωνα με τα δεδομένα του «Προκρούστη» το ποσοστό αντοχής το 2013 έφτασε το 26% παρουσιάζοντας μικρή μείωση σε σχέση με το 2011, πού ήταν στο 30% .

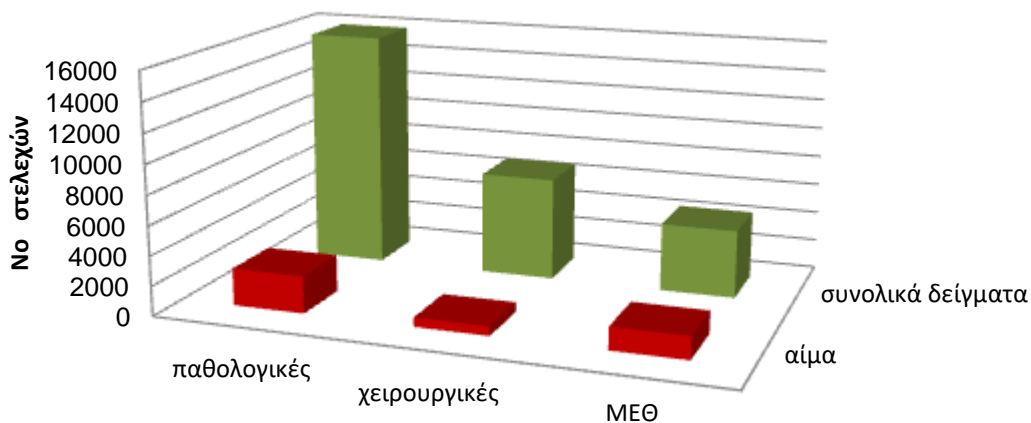
Για το 2016 (μέχρι τη στιγμή συγγραφής της παρούσας διατριβής δεν έχει γίνει επικαιροποίηση του WHONET με τα δεδομένα του 2017) έχουν συγκεντρωθεί τα παρακάτω στοιχεία, που διαμορφώνουν μια εικόνα του προβλήματος της αντοχής στη χώρα μας το συγκεκριμένο διάστημα :

**5 συχνότερα απομονωθέντα gram-αρνητικά το 2016,WHONET
(παθολογικές,χειρουργικές πτέρυγες και ΜΕΘ)**



■ αίμα	E.coli	K.pneum	P.aerug	A.baum	P.mirab
■ συνολικά δείγματα	10193	5882	5037	3774	2600

κατανομή των 5 συχνότερα απομονωθέντων στελεχών ανά πτέρυγα, 2016,WHONET



■ αίμα	παθολογικές	χειρουργικές	ΜΕΘ
■ συνολικά δείγματα	15944	6952	4590

Klebsiella pneumoniae

Results from all hospitals - Blood isolates

(Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2016)

αντιβιοτικό	παθολογικές		χειρουργικές		ΜΕΘ	
	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS
Ticarcillin/Clavulanic acid	310	64	124	71,9	214	93,5
Piperacillin/Tazobactam	568	57,6	181	69,6	255	91,2
Amoxicillin/Clavulanic acid	463	59,0	131	78,9	209	94,1
Cefoxitin	522	48,6	174	61,8	246	75,6
Cefotaxime	475	50,1	129	57,4	173	88,6
Ceftriaxone	453	60,0	148	68,9	207	91,4
Ceftazidime	570	53,2	181	64,3	255	88,4
Aztreonam	467	57,9	154	66,0	216	87,2
Cefepime	523	49,1	172	54,7	250	81,6
Imipenem	570	50,0	181	62,1	255	88,9
Meropenem	486	53,3	169	61,0	247	87,6
Amikacin	570	30,9	180	36,2	255	49,7
Cotrimoxazole	532	44,6	178	41,4	246	58,6
Ciprofloxacin	569	55,8	181	64,2	255	89,0

Escherichia coli

Results from all hospitals - Blood isolates

(Ιανουάριος- Δεκέμβριος 2016)

αντιβιοτικό	παθολογικές		χειρουργικές		ΜΕΘ	
	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS
Ampicillin	1025	56,2	154	59,4	45	63,0
Piperacillin/Tazobactam	1086	7,7	173	9,3	60	14,1
Amoxicillin/Clavulanic acid	936	24,9	122	26,7	43	20,4
Cefotaxime	981	12,9	135	15,2	38	5,7
Ceftazidime	1140	11,4	175	9,4	61	13,1
Aztreonam	811	16,0	129	11,1	46	9,0
Ceftriaxone	778	16,8	126	14,3	45	16,7
Cefepime	983	9,9	157	10,8	51	8,8
Gentamicin	1143	10,1	176	12,6	61	6,2
Tobramycin	972	18,1	146	21,8	41	22,4
Amikacin	1130	2,1	176	4,0	60	4,9
Cotrimoxazole	1068	33,1	172	36,1	61	47,4
Nalidixic acid	513	33,8	72	44,1	31	49,8
Ciprofloxacin	1142	30,9	177	41,8	61	43,9

Proteus mirabilis

Results from all hospitals - Blood isolates

(Ιανουάριος- Δεκέμβριος 2016)

αντιβιοτικό	παθολογικές		χειρουργικές		ΜΕΘ	
	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS
Ampicillin	189	63,5	28	60,0	59	76,7
Amoxicillin/Clavulanic acid	165	42,5	24	25,7	60	61,8
Piperacillin/Tazobactam	204	9,9	30	7,0	75	14,9
Ceftazidime	217	19,5	31	20,4	78	40,3
Cefotaxime	180	20,0	21	14,3	58	44,8
Aztreonam	162	1,9	23	7,7	64	5,1
Ceftriaxone	155	17,1	21	19,6	61	27,1
Cefepime	194	6,2	27	8,0	73	11,6
Gentamicin	216	23,4	31	29,8	78	38,1
Tobramycin	176	29,2	24	18,8	60	50,2
Amikacin	215	6,6	31	2,7	77	15,0
Cotrimoxazole	205	55,5	31	44,6	78	74,0
Nalidixic acid	104	52,9	16	32,8	43	67,0
Ciprofloxacin	220	44,4	31	39,3	78	64,6

Acinetobacter baumannii

Results from all hospitals - Blood isolates

(Ιανουάριος- Δεκέμβριος 2016)

αντιβιοτικό	παθολογικές		χειρουργικές		ΜΕΘ	
	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS
Piperacillin	202	94,2	85	95,6	193	99,5
Piperacillin/Tazobactam	234	93,2	91	96,6	151	99,3
Ampicillin/Sulbactam	243	87,4	111	91,6	237	96,1
Aztreonam	235	97,0	103	100,0	202	99,8
Ceftriaxone	230	98,3	107	100,0	206	99,8
Cefepime	281	90,0	120	94,4	274	98,1
Imipenem	273	90,2	112	92,6	268	97,4
Meropenem	262	89,8	115	94,0	245	98,6
Gentamicin	279	81,3	112	90,4	272	93,5
Tobramycin	206	67,9	68	70,7	194	81,1
Amikacin	249	80,3	102	87,8	238	93,9
Cotrimoxazole	260	75,5	109	82,4	262	87,5
Ciprofloxacin	279	90,6	112	95,0	273	99,3

Pseudomonas aeruginosa

Results from all hospitals- Blood isolates

(Ιανουάριος – Δεκέμβριος 2016)

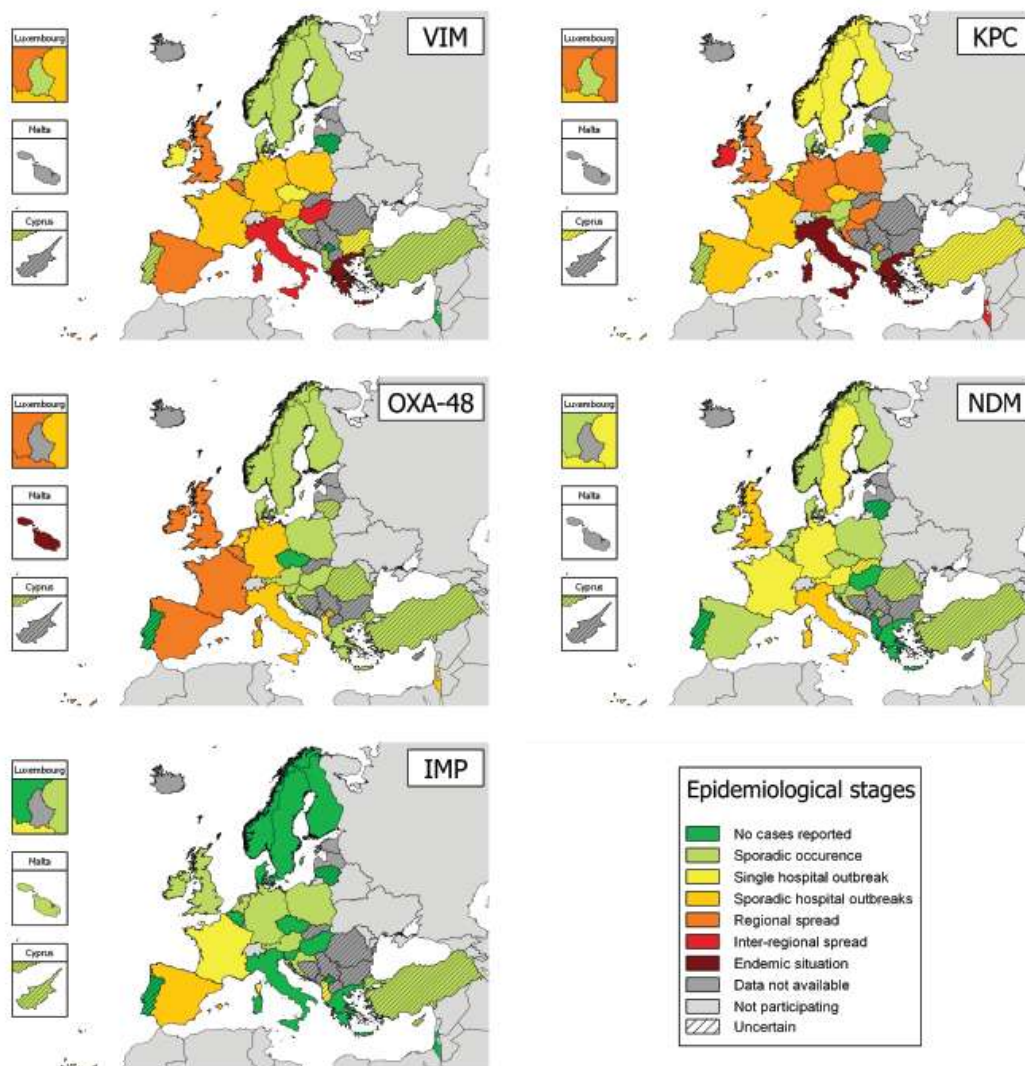
αντιβιοτικό	παθολογικές		χειρουργικές		ΜΕΘ	
	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS	Isolates Tested	%NS
Piperacillin	232	26,9	67	34,0	178	42,4
Piperacillin/Tazobactam	307	19,8	84	27,2	292	28,3
Ticarcillin/Clavulanic acid	196	34,0	57	43,7	141	55,4
Ceftazidime	336	27,7	89	43,0	312	43,1
Cefepime	328	27,8	87	39,3	305	43,9
Aztreonam	287	42,5	66	42,6	234	50,5
Imipenem	334	30,8	90	46,9	311	46,6
Gentamicin	336	28,6	90	36,2	315	35,5
Tobramycin	273	25,9	72	35,5	220	35,1
Amikacin	337	25,0	89	35,1	313	36,0

Με κριτήριο την επιδημιολογική της κατάσταση, η Ελλάδα παρουσιάζει ενδημία ως προς τον επιπολασμό στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Σύμφωνα με το πρόγραμμα επιτήρησης EuSCAPE, στο οποίο συμμετέχουν χώρες της Ευρώπης ,η Τουρκία και το Ισραήλ , το 2013, όσον αφορά στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακά (CRE), τρεις χώρες βρίσκονται σε ενδημική κατάσταση (Ελλάδα, Ιταλία και Μάλτα) και όσον αφορά στο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες *A.baumannii* (CRAB), έξι χώρες έχουν ενδημία (Κροατία, Ελλάδα, Ισραήλ, Ιταλία, Λετονία και Λιθουανία). Μηδενικά κρούσματα έχουν δηλώσει η Ισλανδία και το Μαυροβούνιο [277] .

Η χώρα μας θεωρείται χώρα προέλευσης και διασποράς πολυανθεκτικών παθογόνων σε νοσοκομεία άλλων χωρών της Ευρώπης. Το 2004 σε επιδημική έξαρση στη Γαλλία μετά από νοσηλεία ασθενούς που είχε νοσηλευτεί προηγουμένως στην Ελλάδα απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* με παραγωγή VIM-1 που άνηκαν στον ίδιο κλώνο, που ήταν ταυτόσημος με έναν από τους τρεις κλώνους που απομονώνονταν στην Αθήνα μετά το 2002. Στελέχη που παρήγαν VIM-

26 και VIM-19 απομονώθηκαν σε Σουηδικά νοσοκομεία από δείγματα αίματος και ούρων ασθενών με ιστορικό νοσηλείας στην Ελλάδα [278]. Η μετάδοση από την Ελλάδα στελεχών KPC- *K.pneumoniae* έχει συμβεί σε τουλάχιστον εννέα ευρωπαϊκές χώρες από το 2007 ως το 2010 με τεκμηριωμένη περαιτέρω μετάδοση σε τέσσερις από αυτές [279]

Figure 5. Occurrence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by type of carbapenemases in 38 European countries based on self-assessment by the national experts, March 2013



KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; NDM: New Delhi metallo-beta-lactamase; OXA-48: carbapenem-hydrolysing oxacillinase-48; VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase. In some countries, the epidemiological stage might not represent the exact extent of the spread of CPE as it is a subjective judgment by national experts.. Results presented here reflect the uncertainty at the time of the survey.

εικόνα 38: γεωγραφική διασπορά των τύπων καρβαπενεμασών στα εντεροβακτηριακά. Η Ελλάδα βρίσκεται σε κατάσταση ενδημίας, κατέχοντας την πρώτη θέση. Επικρατούν οι KPC και VIM καρβαπενεμάσες, ενώ προσφάτως αναδύθηκε η παρουσία NDM-1 και OXA-48.



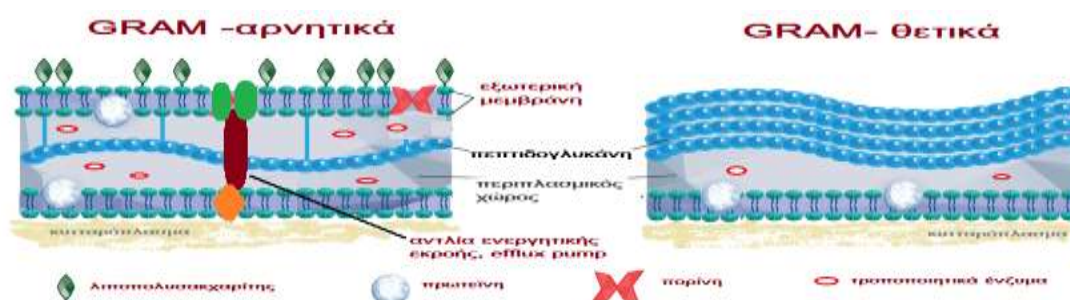
Country	Year	Total Number of Patients	Origin of Patients	Number of Secondary Cases	Probability of the Greek Origin	Mechanisms of Resistance
Belgium	2009	3	3 patients transferred from Greek hospitals	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
Denmark	2009	2	2 patients transferred from Greek hospitals	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
Finland	2009	1	1 patient transferred from Crete	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
France	No data	8	1 patient transferred from Crete	7	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
France	2007	1	1 patient transferred from Crete	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
France	2009	1	1 patient transferred from Greek hospital	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
France	2009	4	1 patient transferred from Greek hospital	3	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
Germany	2007-2008	9	1 patient treated in Greece	8	Hypothetical	<i>blaKPC-2</i>
Hungary	2008	7	1 patient transferred from Greek hospital	6	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
Norway	2007	6	4 patients transferred from Greek hospitals	2	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
Sweden	No data	1	1 patient transferred from Greek hospital	0	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>
The Netherlands	No data	14	African immigrants travelling via Greece	No data	Hypothetical	<i>blaKPC-2</i>
The Netherlands	No data	1	1 patient transferred from Greek hospital	No data	Confirmed	<i>blaKPC-2</i>

εικόνα 39: Η Ελλάδα θεωρείται χώρα προέλευσης MDR παθογόνων σε νοσοκομεία άλλων ευρωπαϊκών χωρών.

4. μηχανισμοί αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων

4.1 κυτταρικό τοίχωμα gram-αρνητικών

Το καθοριστικό χαρακτηριστικό που διακρίνει τα αρνητικά κατά gram βακτήρια από τα gram-θετικά είναι το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα των gram-αρνητικών αποτελείται από την εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, τη στιβάδα πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Η στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης στα gram-αρνητικά είναι λεπτότερη απ' ό,τι στα gram-θετικά. Τη σύνθεσή της καταλύουν οι πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), μεταβολές στο ενεργό κέντρο των οποίων ή υπερπαραγωγή τους οδηγούν στην εμφάνιση αντοχής. Ο μηχανισμός αυτός, όμως, δεν είναι τόσο συνήθης στα gram-αρνητικά όσο είναι στα gram-θετικά. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και μόρια λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και λειτουργεί ως επιλεκτικό φίλτρο διαπερατότητας ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των αντιμικροβιακών παραγόντων. Επίσης, από την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη αποσπώνται κυστίδια, τα κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs), που είτε δεσμεύουν στην επιφάνειά τους αντιβιοτικά είτε μεταφέρουν ένζυμα αδρανοποίησης των αντιβιοτικών, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη της αντοχής. Ο χώρος μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης αποτελεί τον περιπλασματικό χώρο. Μέσα σε αυτόν κυκλοφορούν ένζυμα, σημαντικά για την προστασία του κυττάρου όπως είναι οι β-λακταμάσες. Επίσης, τον διαπερνούν τα σύμπλοκα των αντλιών ενεργητικής εκροής, με τα οποία τα αντιβιοτικά αποβάλλονται εκτός του βακτηρίου. Ο συνδυασμός επιλεκτικής διαπερατότητας, ενεργητικής απομάκρυνσης και ενζυματικής αδρανοποίησης εξηγεί γιατί τα gram-αρνητικά είναι περισσότερο ανθεκτικά από ό,τι τα gram-θετικά και γιατί είναι πιο δύσκολο να ανακαλυφθούν νέα αντιβιοτικά κατά αυτών [104].



4.2 β- λακταμάσες

Η παραγωγή των β-λακταμασών αποτελεί τον κυριαρχικό μηχανισμό ανάπτυξης αντοχής των gram-αρνητικών έναντι των β-λακταμικών αντιμικροβιακών. Οι β-λακτάμες είναι αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος ακετυλιώνοντας τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες , γεγονός που προκαλεί την αποδιοργάνωση του σχήματος του βακτηριακού κυττάρου και οδηγεί τελικά στην θανάτωσή του είτε με την αυτόλυσή του επί ισότονου περιβάλλοντος είτε με την ωσμωτική λύση του επί υπέρτονου περιβάλλοντος είτε με το σχηματισμό επιμηκυσμένων νηματοειδών μορφών για 4-6 γενεές, που τελικά φαγοκυτταρώνονται από τα πολυμορφοπύρρηνα . Πρόκειται, δηλαδή, για βακτηριοκτόνα φάρμακα, που εκδηλώνουν τη δραστηριότητά τους στη φάση πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και όχι στην ηρεμία [281-284]. Είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, είναι χαμηλού κόστους και έχουν λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες[285]. Οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες ,οι μονοβακτάμες και οι καρβαπενέμες αποτελούν τις τέσσερις κατηγορίες των β-λακταμικών .

Η πρώτη χρωμοσωμική πενικιλινάση ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *E.coli* πολύ πριν την κλινική χρήση της πενικιλίνης από τους Abraham και Chain και αργότερα απομονώθηκε η πρώτη πλασμιδιακή από τον Kirby σε στέλεχος *S.aureus* [134,286]. Πρόκειται για πενικιλινάσες που προέκυψαν λόγω της πίεσης επιλογής από τις β-λακτάμες που παράγουν μικροοργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον. Το 1962,η παρουσία πενικιλινάσης ανιχνεύθηκε σε ενδοσπόρια του *Bacillus licheniformis* από αποξηραμένο χώμα στις ρίζες φυτών του 1689 ,που βρίσκονταν στο Βρετανικό Μουσείο. Μετά την εισαγωγή των κεφαλοσπορινών, ο όρος πενικιλινάση θεωρήθηκε ανακριβής και άρχισε να χρησιμοποιείται ο πιο γενικός όρος β-λακταμάση. Η πρώτη πλασμιδιακή β-λακταμάση στα gram-αρνητικά , η TEM-1, απομονώθηκε από στέλεχος *E.coli* από την Κοντομιχάλου [135]. Καθώς νέα παράγωγα β-λακταμικών αντιβιοτικών εισάγονταν διαδοχικά στη θεραπευτική για να υπερκεράσουν την αδρανοποιητική δράση αυτών των ενζύμων, όλο και περισσότερες β-λακταμάσες εμφανίζονταν ως απάντηση των βακτηρίων στην πίεση επιλογής. Επί του παρόντος, η παραγωγή των β-λακταμασών συνιστά τον κύριο μηχανισμό αντοχής στα gram-αρνητικά, η διασπορά τους είναι παγκόσμια και

αφορά τόσο νοσοκομειακά στελέχη όσο και στελέχη κοινότητας. Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν μπορεί να είναι ενδογενή ή επίκτητα, να εδράζονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμιδια και άλλα μεταθετά στοιχεία και η έκφρασή τους να είναι συνεχής ή επαγωγίμη. Εκκρίνονται στον περιπλασμικό χώρο ή μεταφέρονται με τα κυστίδια της εξωτερικής μεμβράνης στο γύρω περιβάλλον. Η καταχώρηση κάθε νέας λακταμάσης μεταφέρθηκε από τον Ιούνιο του 2015 σε νέο ιστότοπο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/submit-beta-lactamase/>.

5. Ταξινόμηση β-λακταμασών

Έχουν προταθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης των β-λακταμασών. Τα πιο διαδεδομένα, κατά χρονολογική σειρά εμφάνισης, είναι τα εξής :

1) ταξινόμηση κατά «Richmond and Sykes»: Οι β-λακταμάσες των gram-αρνητικών βακτηρίων διακρίνονται σε 5 κύριες ομάδες με βάση το είδος των υποστρωμάτων τους [287].

2) ταξινόμηση κατά «Sykes and Matthew» : αποτελεί επέκταση της προηγούμενης ταξινόμησης και δίνει έμφαση στη διάκριση των πλασμιδιακών β-λακταμασών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο [288,289].

3) ταξινόμηση κατά «Ambler»: αποτελεί ένα εύχρηστο σύστημα κατάταξης, που διακρίνει τις β-λακταμάσες σε 4 μοριακές τάξεις A,B,C και D με βάση την νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία [290]. Οι β-λακταμάσες των τάξεων A,C και D έχουν ενεργό κέντρο σερίνης, ενώ οι β-λακταμάσες τάξης B χρειάζονται την παρουσία δισθενών μεταλλικών ιόντων στο ενεργό τους κέντρο για να δρουν.

4) ταξινόμηση κατά «Bush, Jacoby και Medeiros»: πρόκειται για το πιο σύγχρονο ταξινομικό σχήμα, προτάθηκε το 1989, επεκτάθηκε το 1995 και αναθεωρήθηκε το 2010. Οι β-λακταμάσες κατατάσσονται σε 4 λειτουργικές ομάδες με βάση τις βιοχημικές ιδιότητες, τη μοριακή δομή, το είδος υποστρώματος αλλά και το είδος του αναστολέα [291,292].

Στις μέρες μας, επικρατεί μεικτό σύστημα ταξινόμησης συνδυάζοντας τα δυο τελευταία συστήματα (Ambler και Bush).

5.1. Μοριακή ταξινόμηση κατά «Ambler»

Οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε 4 μοριακές τάξεις με βάση την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων τους.

τάξη A: Οι β-λακταμάσες τάξης A είναι ένζυμα που έχουν ενεργό κέντρο σερίνης. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται i) οι σταφυλοκοκκικές πενικιλινάσες ii) οι πλασμιδιακές TEM-1, TEM-2 και SHV-1, που είναι από τις πρώτες που ανιχνεύθηκαν σε gram-αρνητικά iii) οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) ως επί το πλείστον των τύπων TEM, SHV και CTX-M, που υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος και τις μονοβακτάμες. Πιο σπάνιες ESBLs είναι τα μέλη των οικογενειών PER, VEB, BES TLA, SFO και BEL iv) οι β-λακταμάσες τύπου TEM που αναστέλλονται μερικώς από το κλαβουλανικό και ονομάζονται CMTs (Complex Mutant TEM) και εκείνες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και αποτελούν τις IRTs (Inhibitor Resistant TEM) v) οι β-λακταμάσες των οικογενειών PSE και CARB που υδρολύουν την καρβενικιλίνη vi) κεφαλοσπορινάσες, που υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια για την αζτρεονάμη vii) οι σερινο-καρβαπενεμάσες των οικογενειών KPC, GES/IBC, IMI/NMC-A και SME, η SFC-1, η BIC-1 και η SHV-38, οι οποίες υδρολύουν κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, μονοβακτάμες και καρβαπενέμες. Οι KPC και GES έχουν παγκόσμια γεωγραφική κατανομή. Προσφάτως ανακαλύφθηκε και νέα καρβαπενεμάση τάξης A, στη Γαλλία, η FIR-1 [284,290,293-296,443,447].

τάξη B: Είναι μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs), που χρειάζονται ένα ή δύο δισθενή μεταλλικά ιόντα, συνήθως Zn^{+2} , στο ενεργό τους κέντρο για να είναι δραστικές. Υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες εκτός από την αζτρεονάμη. Υποδιαιρούνται περαιτέρω στις υποκατηγορίες B1, B2 και B3 ανάλογα με την ομολογία της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας τους. Αναστέλλονται από μεταλλικούς χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA. Υπάρχουν ενδογενείς χρωμοσωμιακές MBLs, όπως πχ οι L1, CphA, BclI και Sfh-1, αλλά ανησυχητική είναι η ανάδυση και αυξανόμενη διασπορά των επίκτητων MBL όπως είναι οι VIM, IMP και NDM, ενώ τα τελευταία χρόνια εντοπίστηκαν οι SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM, KHM-1, DIM-1, που ακόμη απομονώνονται σπάνια και δεν έχουν διασπαρεί εκτός των ορίων των χωρών

όπου εντοπίστηκαν. Τα ένζυμα αυτών των μέταλλο-β-λακταμασών φέρονται συνήθως σε ιντεγκρόνια 1^{ης} και 3^{ης} τάξης και εντοπίζονται σε πλασμιδια και στο χρωμόσωμα των βακτηρίων [64,284,296-300].

τάξη C: Είναι ένζυμα μεγέθους 34-40 kDa, με σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, που προσδίδουν αντοχή στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, και κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη και κεφοτετάνη) και δεν παρεμποδίζονται σημαντικά από το κλαβουλανικό οξύ. Τα ένζυμα στην πλειοψηφία τους είναι κεφαλοσπορινάσες, εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια προς την αζτρεονάμη απ' ό,τι οι κεφαλοσπορινάσες της τάξης A και χαρακτηρίζονται ως AmpC- β-λακταμάσες. Το πρώτο ένζυμο με δραστηριότητα β-λακταμάσης που εντοπίστηκε αφορούσε τελικά μια AmpC-β- λακταμάση [134]. Διακρίνονται σε χρωμοσωμικές και σε πλασμιδιακές. Οι χρωμοσωμικές AmpCs που ανιχνεύονται σε βακτήρια όπως *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Morganella Morgannii*, *Serratia marcenscens* και *P.aeruginosa* εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα , αλλά μετά από την έκθεσή τους σε κλαβουλανικό οξύ ή σε ορισμένα αντιβιοτικά, όπως πχ αμικικιλίνη ,κεφοξιτίνη, ιμιπενέμη, η έκφραση τους επάγεται (επαγώγιμες, inducible AmpCs). Επίσης, μπορεί να συμβούν μεταλλάξεις στα χρωμοσωματικά αυτά γονίδια που οδηγούν σε μόνιμη αποκαταστολή (derepression) με αποτέλεσμα τη συνεχή υπερπαραγωγή αυτών των ενζύμων και την εμφάνιση φαινότυπου αντοχής [301]. Οι πλασμιδιακές AmpC κατατάσσονται σε 8 υποομάδες με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία τους: ACC, ACT, CFE, CMY, FOX, MOX, MIR και DHA. Έχουν παγκόσμια διασπορά και απομονώνονται όλο και συχνότερα, κυρίως οι CMY. Συχνά, στελέχη που παράγουν πλασμιδιακές AmpC-β- λακταμάσες εκφράζουν ταυτόχρονα και ESBLs δυσχεραίνοντας έτσι την φαινοτυπική ανίχνευσή τους [302]. Στην τάξη C, επίσης, ανήκουν και οι εκτεταμένου φάσματος AmpC-β- λακταμάσες (ESAC), που παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι της κεφταζιδίμης. Αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να αναδυθεί όταν η παραγωγή των AmpC-β- λακταμασών συνδυαστεί με μειωμένη έκφραση πορινών, υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής ή παρουσία τροποποιημένων πορινών. Αυτό μέχρι σήμερα αφορά κυρίως ένζυμα της υποομάδας των ESAC, όπως ACT-1, CMY-2, CMY-10, ADC-33, ADC-68 και DHA-1, τα οποία αποκτούν επιπλέον δράση καρβαπενεμάσης [303-309].

τάξη D: Είναι ως επί το πλείστον πλασμιδιακές β-λακταμάσες που εντοπίζονται σε gram-αρνητικά βακτήρια. Τα πρώτα ένζυμα που αναγνωρίστηκαν είναι ουσιαστικά πενικιλινάσες, που σε αντιδιαστολή με τις β-λακταμάσες της τάξης A υδρολύουν την οξακιλλίνη και κλοξακιλλίνη σε βαθμό τουλάχιστον >50% σε σχέση με τη βενζυλπενικιλίνη και γιαυτό ονομάστηκαν και οξακιλλινάσες και δόθηκε το πρόθεμα OXA. Έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο [310]. Στις αρχές του 1990 απομονώθηκε από στέλεχος *P.aeruginosa* μια πλασμιδιακή β-λακταμάση που εκτός από την καρβενικιλίνη υδρόλυε και την οξακιλλίνη. Αρχικά είχε λανθασμένα ενταχθεί στην οικογένεια PSE της τάξης A ως PSE-2, όμως αργότερα θεωρήθηκε ότι ανήκει στην τάξη D και μετονομάστηκε σε OXA-10 [311]. Από την OXA-10 προέκυπταν διαδοχικά με αντικαταστάσεις αμινοξέων παράγωγα, που παρουσίαζαν διευρυμένο φάσμα υδρόλυσης περιλαμβάνοντας και τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος. Έτσι, δημιουργήθηκε μία υποκατηγορία στην τάξη D, στην οποία εντάσσονται οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες τύπου OXA (OXA-type ESBLs), η πλειονότητα των οποίων προέρχεται από την OXA-10. Μια δεύτερη υποκατηγορία της τάξης D σχηματίστηκε για συμπεριλάβει ένζυμα OXA που παρουσίαζαν υδρολυτική ικανότητα καρβαπενεμασών. Οι OXA-τύπου καρβαπενεμάσες ταξινομούνται περαιτέρω σε 12 υποτάξεις: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229 και OXA-235 [304, 310].

5.2. λειτουργική ταξινόμηση κατά «Bush, Jacoby και Medeiros»

Το σύστημα αυτό ταξινομεί τις β-λακταμάσες σε ομάδες και υποομάδες με βάση τις λειτουργικές ιδιότητες τους ως προς το υπόστρωμα δράσης τους (πενικιλίνη, οξακιλλίνη, καρβενικιλίνη, κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος, κεφαμυκίνες μονοβακτάμες και καρβαπενέμες) και ως προς το είδος του αναστολέα (κλαβουλανικό οξύ, ταζοβακτάμη, EDTA) [292,312].

Ομάδα 1 - κεφαλοσπορινάσες: Σ' αυτήν την ομάδα ανήκουν οι AmpC κεφαλοσπορινάσες της τάξης C κατά Ambler. Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες και κεφαμυκίνες. Δεν υδρολύουν την κεφεπίμη. Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και την ταζοβακτάμη. Παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για την αζτρεονάμη. Η ομάδα 1 περιλαμβάνει μία υποομάδα:

-υποομάδα 1e: Περιέχει κεφαλοσπορινάσες με μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι κεφταζιδίμης σαν αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων. Αποκαλούνται εκτεταμένου φάσματος AmpC-β- λακταμάσες (ESAC).

Όπως ήδη αναφέρθηκε , κάποιες από τις κεφαλοσπορινάσες της ομάδας 1 μπορούν να αποκτήσουν υδρολυτική ικανότητα καρβαπενεμάσης όταν συνυπάρχει απώλεια ή διαταραχή πορινών.

Ομάδα 2 - β-λακταμάσες σερίνης: Περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες των μοριακών τάξεων A και D κατά Ambler. Είναι η πολυπληθέστερη ομάδα και διαιρείται σε 8 υποομάδες.

-υποομάδα 2a: είναι πενικιλινάσες στενού φάσματος, που ανιχνεύονται στους Gram-θετικούς κόκκους. Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη. Στην πλειοψηφία τους είναι χρωμοσωμικές.

-υποομάδα 2b: περιλαμβάνει τις β-λακτάμασες που υδρολύουν πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς (κεφαλοριδίνη, κεφαζολίνη, κεφαλοθίνη) Αναστέλλονται ισχυρά από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι TEM-1,TEM-2 και SHV-1.

-υποομάδα 2be: περιλαμβάνει τις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs). Υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και τις μονοβακτάμες. Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη .Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι ESBLs του τύπου TEM και του τύπου SHV,οι οποίες προέρχονται με μεταλλάξεις από τις TEM-1,TEM-2 και SHV-1. Επίσης, στην υποομάδα αυτή ανήκουν και οι ESBLs του τύπου CTX-M, που από τις αρχές του 2000 επικρατούν παγκοσμίως και κυρίως η CTX-M-15.Οι CTX-M αναστέλλονται ισχυρότερα από την ταζοβακτάμη απ' ό,τι οι TEM- και SHV-ESBLs. Μέλη της υποομάδας αποτελούν και πιο σπάνιες ESBLs όπως οι PER,SFO,VEB.

-υποομάδα 2br: περιλαμβάνει β-λακταμάσες που υδρολύουν πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες πρώτης και δεύτερης γενεάς. Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ονομάζονται IRTs (Inhibitor Resistant TEM) .Δεν θεωρούνται ESBLs, αν και συχνά περιγράφονται μαζί.

-υποομάδα 2ber: Σε αυτήν κατατάσσονται β-λακταμάσες που υδρολύουν πενικιλίνες ,κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και μονοβακτάμες. Αναστέλλονται ασθενώς από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη. Ονομάζονται CMTs (Complex Mutant TEM).

-υποομάδα 2c: ανήκουν οι πενικιλινάσες που υδρολύουν ταχύτατα την καρβενικιλίνη και την τικαρκιλλίνη. Αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Εδώ ανήκουν οι PSE και CARB.

-υποομάδα 2d : εδώ συγκεντρώνονται οι OXA β-λακταμάσες , της μοριακής τάξης D κατά Ambler.Υδρολύουν ταχέως την οξακιλλίνη και την κλοξακιλλίνη. Δεν αναστέλλονται πάντα από το κλαβουλανικό οξύ. Πολλές από αυτές αναστέλλονται παρουσία NaCl.

-υποομάδα 2de: Περιλαμβάνει τις εκτεταμένου φάσματος OXA β-λακταμάσες. Οι περισσότερες έχουν προκύψει με σημειακές μεταλλάξεις στην OXA-10. Υδρολύουν τις πενικιλίνες και τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες. Δεν αναστέλλονται πάντα από το κλαβουλανικό. Ανήκουν στις ESBLs.

-υποομάδα 2df: Συγκεντρώνει τις OXA β-λακταμάσες που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις καρβαπενέμες. Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό.

-υποομάδα 2e: Σ' αυτήν υπάγονται οι κεφαλοσπορινάσες της μοριακής τάξης A κατά Ambler που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες. Διακρίνονται από τις κεφαλοσπορινάσες της ομάδας 1 (AmpC-β-λακταμάσες της τάξης C) από την ιδιότητά τους να αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζοβακτάμη, ενώ παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια για την αζτρεονάμη.

-υποομάδα 2f: περιέχει τις καρβαπενεμάσες σερίνης της μοριακής τάξης A κατά Ambler.Υδρολύουν τις καρβαπενέμες, τις κεφαλοσπορίνες , τις πενικιλίνες και τις κεφαμυκίνες. Αναστέλλονται ασθενώς από τους β-λακταμικούς αναστολείς, με την ταζοβακτάμη να υπερτερεί του κλαβουλανικού. Έντονη ανησυχία προκαλούν οι KPC- καρβαπενεμάσες , που απομονώνονται με μεγάλη συχνότητα και έχουν παγκόσμια εξάπλωση.

Ομάδα 3 - μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs): περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες τάξης B κατά Ambler, που για τη δράση τους απαιτούν ένα ή δυο ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο. Διακρίνονται δύο λειτουργικές υποομάδες.

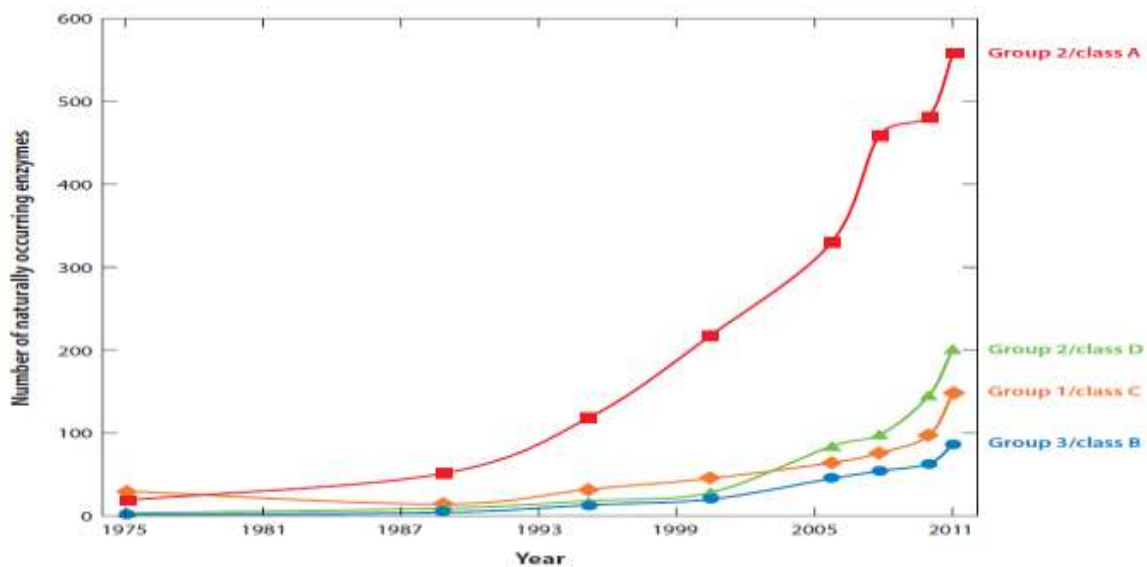
-υποομάδα 3a: περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες IMP ,VIM και NDM. Υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες εκτός από τις μονοβακτάμες. Αναστέλλονται από το EDTA. Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και την ταζοβακτάμη.

-υποομάδα 3b: περιέχει λίγες MBLs , που υδρολύουν κατά προτίμηση καρβαπενέμες. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι ασκούν την υδρολυτική τους δράση όταν διαθέτουν ένα ιόν ψευδαργύρου, ενώ η προσθήκη δευτέρου τις αναστέλλει. Αναστέλλονται από το EDTA. Δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και την ταζοβακτάμη.

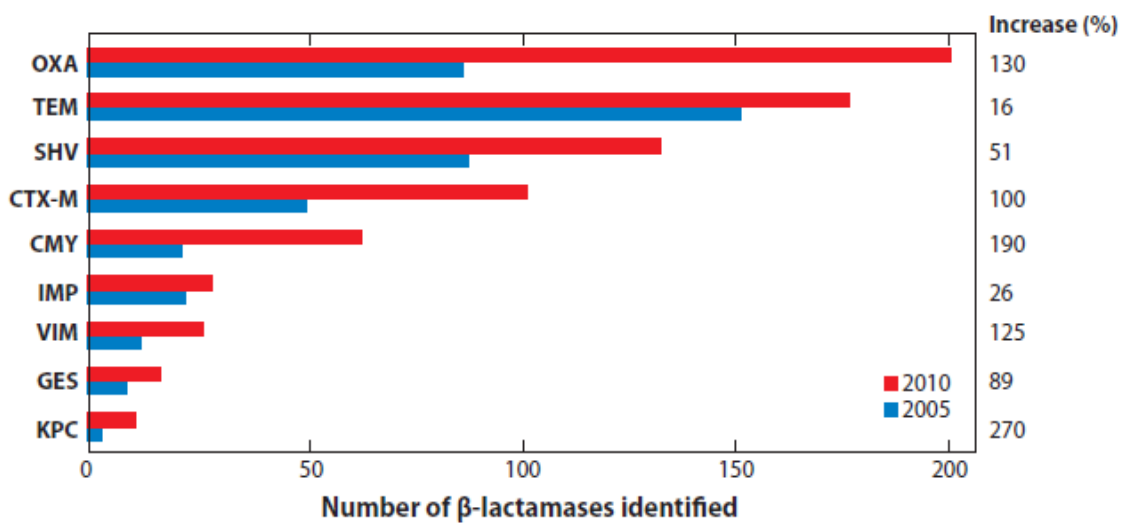
Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται η αντιστοίχιση των 2 συστημάτων:

σύστημα Bush-Jacoby	σύστημα Ambler	προτιμητέα υποστρώματα	αναστολή από CLA	αντιπροσωπευτικά ένζυμα
1	C	κεφαλοσπορίνες ,κεφαμυκίνες	-	AmpC, CMY-2,FOX-1
1e	C	κεφαλοσπ-κεφαμυκ-μονοβακταμ	-	ESAC
2a	A	πενικιλίνες	+	σταφυλοκοκκικές
2b	A	στενού φάσματος κεφαλοσπ.	+	SHV-1,TEM-1,TEM-2
2be	A	ευρέος φάσματος κεφ- μονοβακτ	+	ESBLs (TEM,SHV,CTX-M)
2br	A	στενού φάσματος κεφαλοσπ.	-	IRTs
2ber	A	ευρέος φάσματος κεφ- μονοβακτ	+/-	CMTs
2c	A	καρβενικιλίνη	+	PSE-1,-3,-4, CARB
2d	D	κλοξακιλλίνη, οξακιλλίνη	+/-	OXA-1 ως OXA-10
2de	D	ευρέος φάσματος κεφαλοσπ.	+/-	OXA-ESBLs :OXA-11,-15
2df	D	καρβαπενέμες, οξακιλλίνη	+/-	OXA-23,OXA-48
2e	A	κεφαλοσπορίνες	+	CepA
2f	A	καρβαπενέμ-κεφαλοσπ-κεφαμυκ	-	IMI,KPC,GES,SME,SHV38
3a	B	β-λακταμες,εκτος μονοβακταμης	[EDTA]	IMP,VIM,NDM-1
3b	B	καρβαπενέμες	[EDTA]	ChpA,Sfh-1

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 1000 β-λακταμάσες. Η πιο πολυπληθής ομάδα είναι η τάξη A κατά Ambler (ομάδα 2 κατά Bush-Jacoby), με περισσότερα από 550 ένζυμα. Οι κατά Ambler τάξεις A, C και D αποτελούν τις πιο ραγδαία αυξανόμενες τάξεις τα τελευταία 10 χρόνια, με ποσοστιαίες αυξήσεις κατά τουλάχιστον 130% , και ειδικότερα όσον αφορά στις οικογένειες των CTX-M , OXA , CMY και KPC , που σχεδόν διπλασιαστήκαν . Αντίθετα, οι νέες αφίξεις στην οικογένεια των TEM-ESBLs, SHV-ESBLs και IMP ήταν λιγότερες (εικόνες 40,41) [312].



εικόνα 40: περισσότερες από 1000 β-λακταμάσες έχουν ανιχνευτεί. Τα τελευταία 15 χρόνια η αύξησή τους είναι ραγδαία.



εικόνα 41: ο αριθμός των β-λακταμασών το 2005 και το 2010. Σημειώθηκε αύξηση κατά 130% στις OXA- λακταμάσες, κατά 270% στις KPC, κατά 190% στις CMY, κατά 125% στις VIM

6. εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs)

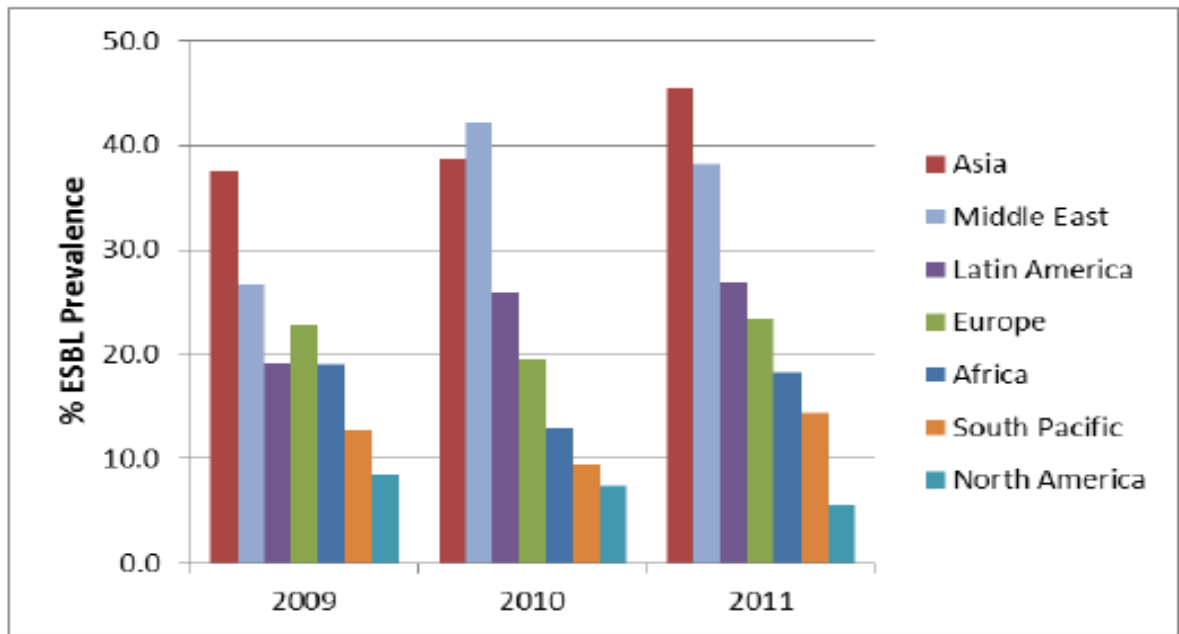
Οι κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς (ευρέος φάσματος) και οι μονοβακτάμες εισήχθησαν στην κλινική πράξη στις αρχές του 1980 για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αντοχής λόγω της αυξημένης επικράτησης των β-λακταμασών στα συνήθη παθογόνα, όπως των TEM-1 και SHV-1 στα *E.coli* και *K.pneumoniae*, και της διασποράς αυτών και σε άλλα είδη βακτηρίων. Σύντομα όμως μετά την κλινική εφαρμογή τους, μόλις 2 χρόνια μετά, εμφανίστηκε αντοχή σε αυτές.

Η πρώτη αναφορά β-λακταμάσης ικανής να υδρολύει τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος ήταν το 1983 στη Γερμανία. Ήταν μια πλασμιδιακή β-λακταμάση, που προέκυψε μετά από σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της SHV-1 [313]. Σύντομα ανακαλύφθηκαν και άλλες β-λακταμάσες που μπορούσαν να υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος. Και αυτές οι πρώτες εκτετατές φάσματος β-λακταμάσες ήταν παράγωγα των TEM-1, TEM-2 και SHV-1 μέσω σημειακών μεταλλάξεων [314,315]. Οι νέες αυτές β-λακταμάσες με τη διευρυμένη υδρολυτική δράση ονομάστηκαν β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (extended spectrum beta lactamases, ESBLs).

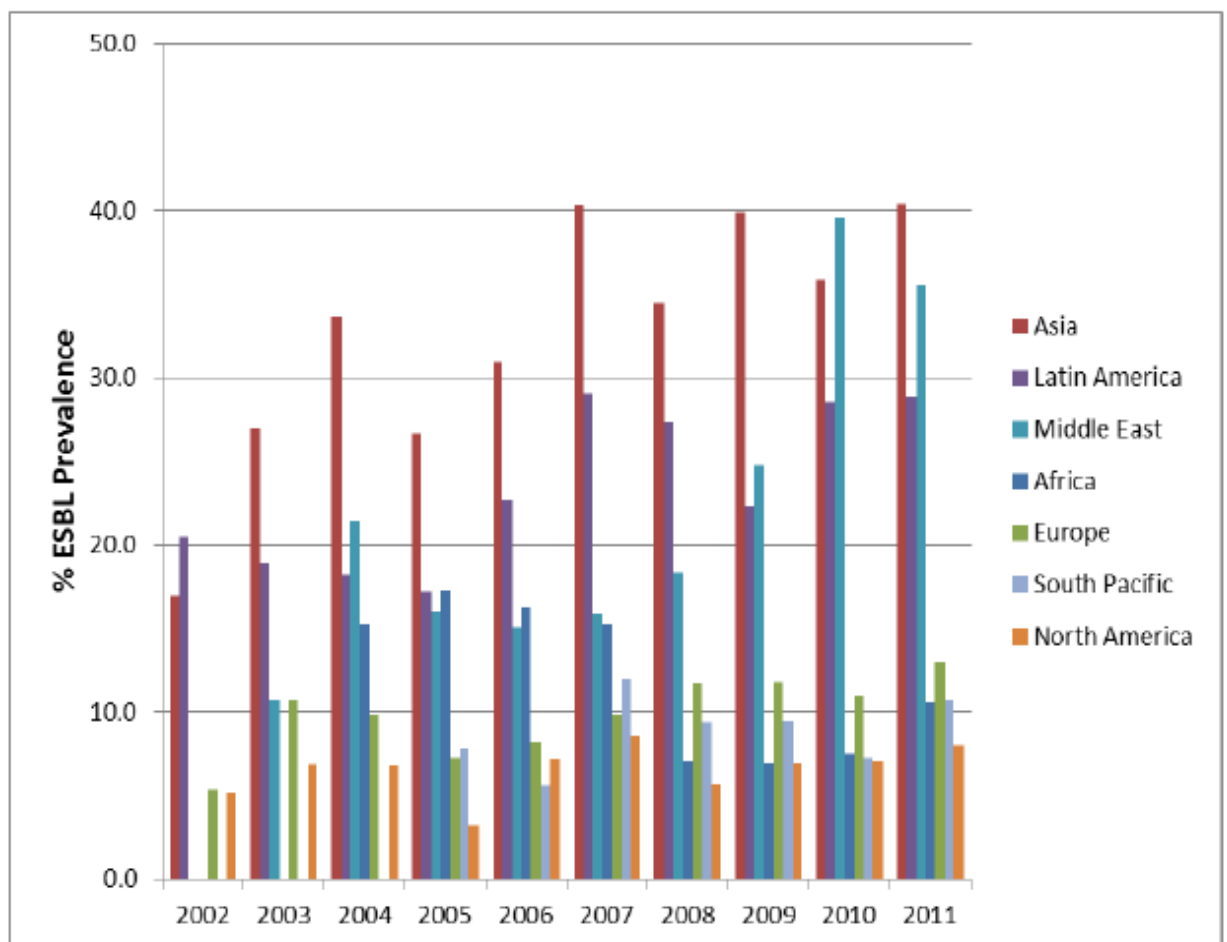
Οι ESBLs στην πλειονότητά τους ταξινομούνται στη μοριακή τάξη A κατά Ambler και κατά το σύστημα Bush-Jacoby, στην ομάδα 2be με κύριους εκπρόσωπους τις οικογένειες TEM, SHV και CTX-M. Έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο. Υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος και μονοβακτάμες. Αναστέλλονται από κλαβουλανικό και ταζοβακτάμη, γνώρισμα που αξιοποιείται στην εργαστηριακή ανίχνευσή τους. Στις ESBLs περιλαμβάνονται κάποια ένζυμα από την τάξη D, οι ESBLs τύπου OXA (λειτουργική ομάδα 2de) και προέρχονται κυρίως με σημειακές μεταλλάξεις της OXA-10. Υδρολυτική δράση κατά των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος παρουσιάζουν και κάποια ένζυμα από τη μοριακή τάξη C, οι εκτεταμένου φάσματος AmpC-κεφαλοσπορινάσες (ESAC), που σύμφωνα με κάποιους ερευνητές ανήκουν και αυτές στις ESBLs [312,316-318]. Επομένως, από λειτουργική άποψη, σύμφωνα με το σύστημα Bush- Jacoby, τα ένζυμα των ομάδων 2be και 2de χαρακτηρίζονται ως ESBLs.

Ο συνολικός τους αριθμός των ESBLs υπερβαίνει τις 500, ενώ συνεχώς προστίθενται νέα μέλη. Οι ESBLs είναι εξαιρετικά διαδομένες σε στελέχη εντεροβακτηριακών (πχ *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp, *Serratia marcescens*), αζυμωτικών παθογόνων όπως *A.baumannii* και *P.aeruginosa*. Σύμφωνα με το CDC, τα εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs συνιστούν σοβαρή απειλή για τη Δημόσια Υγεία, στις ΗΠΑ ευθύνονται για 26000 νοσοκομειακές λοιμώξεις (HAIs) ετησίως, αντιπροσωπεύουν το 19% περίπου των HAIs και οδηγούν σε 1700 θανάτους κατ' έτος [19]. Σε διάφορα σημεία σε όλο τον κόσμο έχουν αναφερθεί μεγάλες επιδημίες, ενώ το πρόβλημα φαίνεται να έχει αποκτήσει ενδημικές διαστάσεις, με ποσοστά που υπερβαίνουν κατά πολύ το 50% σε ορισμένες χώρες, όπως την Ινδία (>80%), την Κίνα (>60%), την Τουρκία (>50%). Στην Νότια Ευρώπη και τα Βαλκάνια, τη Μέση Ανατολή, τη Λατινική Αμερική τα ποσοστά υπερβαίνουν το 25%, ενώ σε χώρες της Βόρειας Αμερικής, της Βόρειας Ευρώπης και την Αυστραλία, τα ποσοστά των ESBL-εντεροβακτηριακών είναι χαμηλότερα (<10%). Ειδικότερα σύμφωνα με το ECDC, στην Ελλάδα το 2016, η αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς για το *E.coli* ήταν 17,6% και για την *K.pneumoniae* ήταν 72,5%, με το 85-90% των απομονωθέντων στελεχών να είναι παραγωγείς ESBLs [196,207,214,215,226,319].

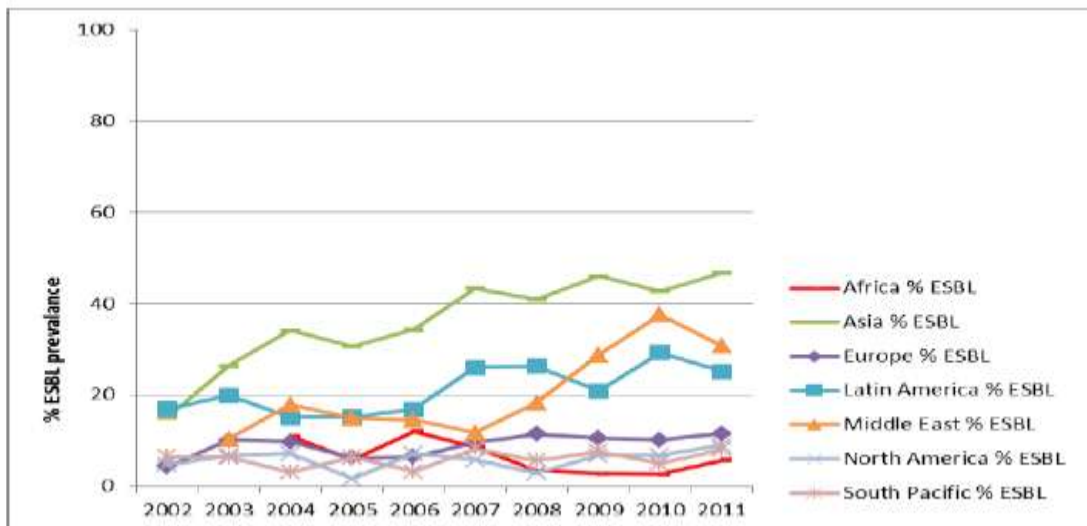
Η ακριβής επίπτωση των ESBLs στα gram-αρνητικά δεν είναι γνωστή. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να υπάρχουν προγράμματα επιτήρησης που περιλαμβάνουν πολλές χώρες μιας περιοχής, όπως πχ EARS-net για την Ευρώπη. Υπάρχουν λίγες παγκόσμιες μελέτες που να δίνουν στοιχεία για τη συχνότητα των ESBLs στα εντεροβακτηριακά. Η μελέτη SMART είναι ένα παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης, που συνεχίζει να διεξάγεται. Παρακολουθεί τα επίπεδα της αντοχής σε στελέχη gram-αρνητικών που αποτελούν αίτια ουρολοιμώξεων και ενδοκοιλιακών λοιμώξεων. Σύμφωνα με στοιχεία της από την περίοδο 2002-2011, η συχνότητα των ESBLs είναι ιδιαίτερα υψηλή στην Ασία, τη Μέση Ανατολή και τη Λατινική Αμερική. Επίσης, κατά τη διάρκεια της μελέτης διαπιστώθηκε η συνύπαρξη ESBLs με καρβαπενεμάσες, ενώ ανακαλύφθηκαν και νέα μέλη ESBLs (πχ SHV-129). Στη συνέχεια ακολουθούν τα διαγράμματα της συχνότητας ESBL σε στελέχη *E.coli*, *Klebsiella* spp, *P.mirabilis* από τη μελέτη SMART [571].



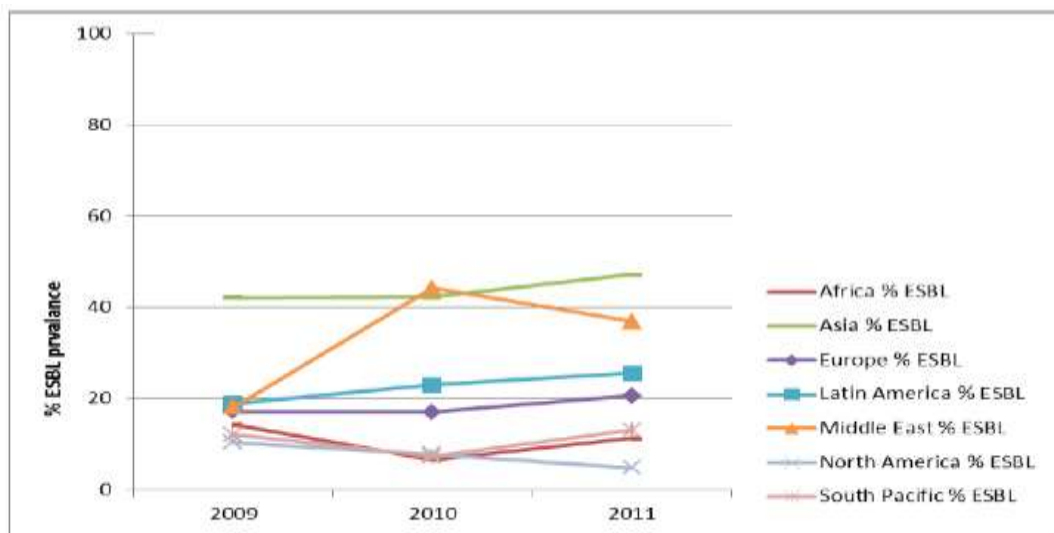
συχνότητα ESBLs σε στελέχη *E.coli*, *Klebsiella spp* και *P.mirabilis* από λοιμώξεις ουροποιητικού, SMART 2009-2011



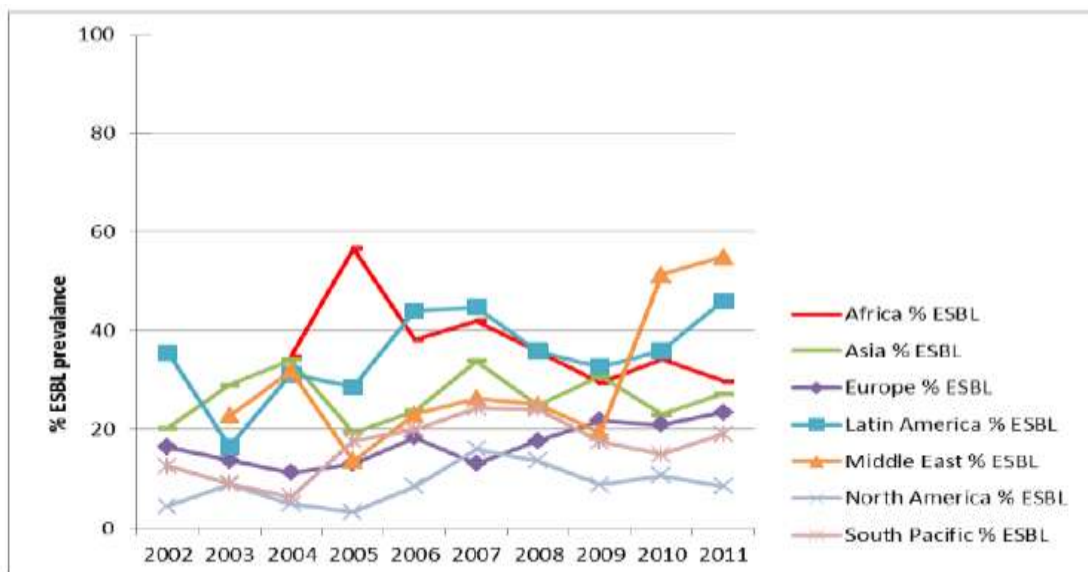
συχνότητα ESBLs σε στελέχη *E.coli*, *Klebsiella spp* και *P.mirabilis* από ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, SMART 2002-2011



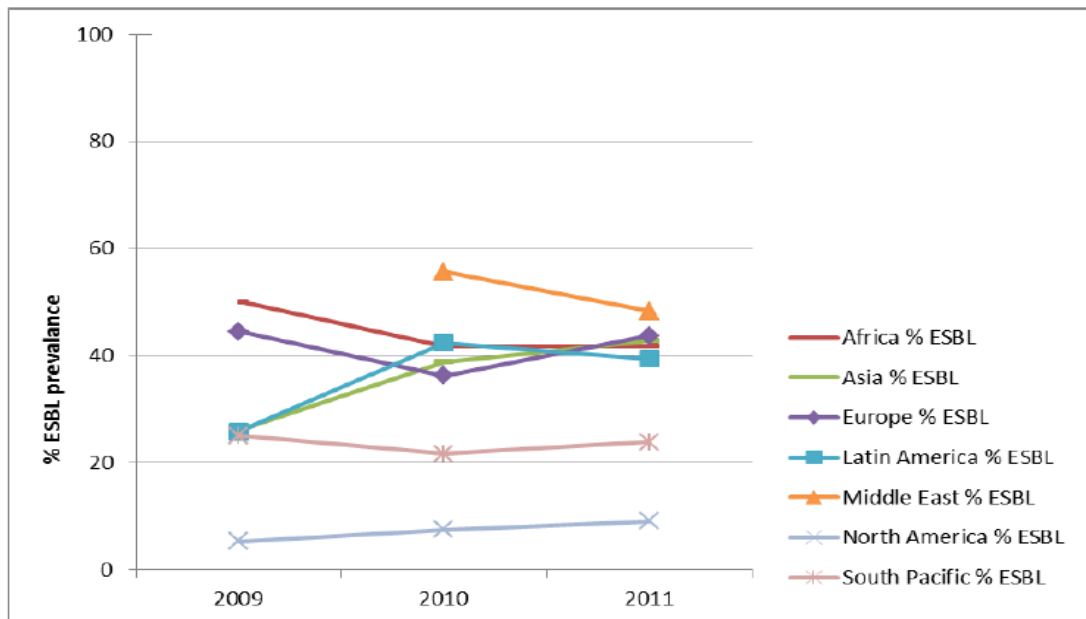
συχνότητα απομόνωσης ESBL-θετικών *E.coli* από ενδοκοιλιακές λοιμώξεις ,SMART 2002-2011



συχνότητα απομόνωσης ESBL-θετικών *E.coli* από λοιμώξεις ουροποιητικού ,SMART 2009-2011



συχνότητα απομόνωσης ESBL-θετικών *K.pneumoniae* από ενδοκοιλιακές λοιμώξεις ,SMART 2002-2011



συχνότητα απομόνωσης ESBL-θετικών *K.pneumoniae* από λοιμώξεις ουροποιητικού, SMART 2009-2011

Οι βακτηριαμίες από ESBLs είναι συχνές και διακρίνονται από παράταση νοσηλείας και αυξημένη θνησιμότητα. Προσφάτως έγινε μια διεπιστημονική προσπάθεια να διαμορφωθεί ένα εύκολο εργαλείο υπολογισμού θνησιμότητας 30 ημερών, ώστε να εντοπίζονται όσοι από τους ασθενείς με αιματογενείς λοιμώξεις από ESBL-στελέχη είναι υψηλού κινδύνου. Συγκεκριμένα, υψηλή βαθμολογία συγκεντρώνεται όταν η ηλικία είναι άνω των 50 ετών (3 βαθμοί), όταν το αίτιο είναι η *Klebsiella* spp (2 βαθμοί), όταν η 1οπαθής εστία είναι άλλη εκτός του ουροποιητικού (3 βαθμοί), όταν υπάρχει σοβαρή υποκείμενη νόσος (4 βαθμοί), όταν το Pitt score είναι άνω του 3 (βαθμοί 3), όταν εγκαταστάθηκε σηπτική καταπληξία άμα τη εμφανίσει (4 βαθμοί), ακατάλληλη αρχική θεραπευτική παρέμβαση (2 βαθμοί). Η πιθανότητα θανάτου σε ασθενείς με βαθμολογία >11 προσεγγίζει το 50% [327].

6.1. SHV-ESBLs

Η SHV- 1 είναι μία β-λακταμάση στενού φάσματος, με υδρολυτική δραστηριότητα έναντι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών πρώτης και δεύτερης γενεάς, και το γονίδιο της εντοπίζεται στο χρωμόσωμα των περισσότερων στελεχών *K.pneumoniae*. Το γονίδιο της, επίσης, εντοπίζεται πολύ συχνά και σε πλασμίδια. Η

πρώτη ESBL που ανακαλύφθηκε ήταν πλασμιδιακή, εντοπίστηκε σε στελέχη *Klebsiella* spp και παρουσίαζε σημαντική ομολογία με την SHV-1 [313]. Το νέο αυτό ένζυμο ονομάστηκε SHV-2 και η αλληλούχιση έδειξε ότι αυτή η λακταμάση προέκυψε με σημειακή μετάλλαξη από την SHV-1, που οδήγησε στην αντικατάσταση μίας γλυκίνης από μία σερίνη στη θέση 238 [320,321]. Τα επόμενα χρόνια της ανακάλυψης αυτής της β-λακταμάσης, στελέχη που ήταν παραγωγείς της SHV-2 εντοπίστηκαν σε όλον τον κόσμο, ενώ προέκυψαν και νέες παραλλαγές. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον 100 SHV-ESBLs. Η πλειονότητα των SHV ESBL έχει από μία (πχ SHV-2, SHV-6, SHV-8) έως έξι (SHV-128) υποκαταστάσεις αμινοξέων σε σύγκριση με SHV-1 υποδεικνύοντας ότι ακόμη και μια απλή αντικατάσταση αμινοξέος είναι αρκετή για να διευρύνει την υδρολυτική ικανότητα. Οι SHV-ESBLs συνήθως κωδικοποιούνται σε πλασμίδια που συχνά φέρουν γονίδια αντοχής και για άλλες κατηγορίες φαρμάκων. Είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλον τον κόσμο. Όσον αφορά στα εντεροβακτηριακά αφορούν κατά κύριο λόγο στελέχη *K.pneumoniae* και *E.coli* (18 περίπου παραλλαγές έχουν περιγραφεί αποκλειστικά σε κλινικά στελέχη *K.pneumoniae* και 4 παραλλαγές σε *E.coli*), αλλά τα τελευταία χρόνια και άλλα είδη εντεροβακτηριακών παράγουν SHV-ESBLs, όπως *Enterobacter* spp, *P.stuartii*, *P.mirabilis* [322,323]. Όσον αφορά στα άλλα gram-αρνητικά βακτήρια, SHV-ESBLs έχουν σποραδικά αναφερθεί σε κλινικά στελέχη *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Aeromonas caviae* [324-326]. Επιτυχημένες παραλλαγές με παγκόσμια διασπορά είναι οι SHV-2, SHV-2a, SHV-5 και SHV-12 [331]. Στην Ελλάδα επικρατεί η SHV-5. Οι SHV-ESBLs μαζί με τις CTX-M-ESBLs είναι οι συχνότεροι τύποι ESBLs.

6.2. TEM-ESBLs

Οι TEM-ESBLs είναι παράγωγα των TEM-1 και TEM-2 β-λακταμασών. Η TEM-1 ανακαλύφθηκε το 1965 σε στέλεχος *E.coli*, που απομονώθηκε από έλληνα ασθενή με βακτηριαιμία ονόματι Τεμονιέρα, εξού και το πρόθεμα TEM [135]. Η TEM-1 είναι η συχνότερα απαντώμενη β-λακταμάση στα gram-αρνητικά. Προσδίδει αντοχή στην αμπικιλίνη. Η TEM-2 προκύπτει από την TEM-1 με σημειακή μετάλλαξη που οδηγεί στην αντικατάσταση μίας γλουταμίνης από μία λυσίνη στη θέση 39. Η αντικατάσταση αυτή δεν έχει καμία επίδραση στο υδρολυτικό προφίλ. Η μόνη αλλαγή που επέφερε αφορούσε το ισοηλεκτρικό σημείο [319]. Οι TEM-1 και TEM-2

(όπως και η TEM-13) έχουν ,επομένως, στενό υδρολυτικό φάσμα και δεν είναι ESBLs. Το 1984, όμως, στη Γαλλία απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* που ανέπτυξαν αντοχή στις οξυ-ιμινοκεφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη ,κεφοταξίμη) λόγω της παραγωγής μιας νέας β-λακταμάσης, στην οποία δόθηκε αρχικά το όνομα CTX-1 εξαιτίας της αυξημένης δραστηριότητας της ενάντια στην κεφοταξίμη. Αργότερα , το ένζυμο αυτό μετονομάστηκε σε TEM-3 και αποτέλεσε την πρώτη περιγραφείσα TEM-ESBL. Η αλληλούχιση έδειξε ότι η TEM-3 διέφερε από την TEM-2 σε 2 αμινοξέα: Λυσίνη αντί γλουταμινικού οξέος στη θέση 102 και σερίνης αντί γλυκίνης στη θέση 236 [314, 328]. Αν και η TEM-3 είναι η πρώτη TEM-ESBL που περιγράφηκε, θεωρείται κατόπιν αναδρομικής μελέτης στελεχών ότι η πρώτη εμφάνιση TEM-ESBL αφορούσε μια πλασμιδιακή β-λακταμάση σε στελέχη *K.oxytoca* από επιδημία σε μονάδα νεογνών στο Λίβερπουλ της Αγγλίας το 1982, τα οποία ανέπτυξαν αντοχή στην κεφταζιδίμη σαν απάντηση στην πίεση επιλογής ,καθώς το φάρμακο που δόθηκε στα νεογνά ήταν η κεφταζιδίμη. Η υπεύθυνη λακταμάση ήταν η TEM-12 [329].Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των TEM-ESBL ξεπερνά τις 80. Οι σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την επέκταση της υδρολυτικής ικανότητας και την ανάδειξη νέων TEM-ESBLs (ειδικότερα: Glu104Lys, Arg164Ser,Gly238Ser,Glu240Lys).Οι TEM-3, TEM-10, TEM-24, TEM-26, TEM-52 και TEM-116 είναι οι παραλλαγές που έχουν εξαπλωθεί σε πολλές χώρες. Μελέτες δείχνουν ότι οι επικρατέστεροι τύποι στις ΗΠΑ είναι οι TEM-10,-12,-26 και στην Ευρώπη είναι οι TEM-3 και TEM-24 [330,331]. Οι TEM-ESBLs απαντώνται κατά κύριο λόγο σε στελέχη *K.pneumoniae* και *E.coli* , ωστόσο με αυξανόμενη συχνότητα απομονώνονται τόσο από άλλα είδη εντεροβακτηριακών όσο και από μη εντεροβακτηριακά, όπως *P.aeruginosa* [332].

6.3. CTX-M-ESBLs

Ενώ μέλη των οικογενειών SHV και TEM κυριαρχούσαν στην επιδημιολογία των ESBLs τις δεκαετίες του 1980 και του 1990 ,προκαλώντας ως επί το πλείστον κρούσματα σε νοσοκομεία από στελέχη *K.pneumoniae* και *E.coli*, μια νέα οικογένεια β-λακταμασών στις αρχές του 2000 έκανε δυναμικά την εμφάνισή της αλλάζοντας τον επιδημιολογικό χάρτη [319,354].Πρόκειται για πλασμιδιακές β-λακταμάσες που κατά προτίμηση υδρολύουν την κεφοταξίμη (γιαυτό αποκαλούνται κεφοταξιμάσες)

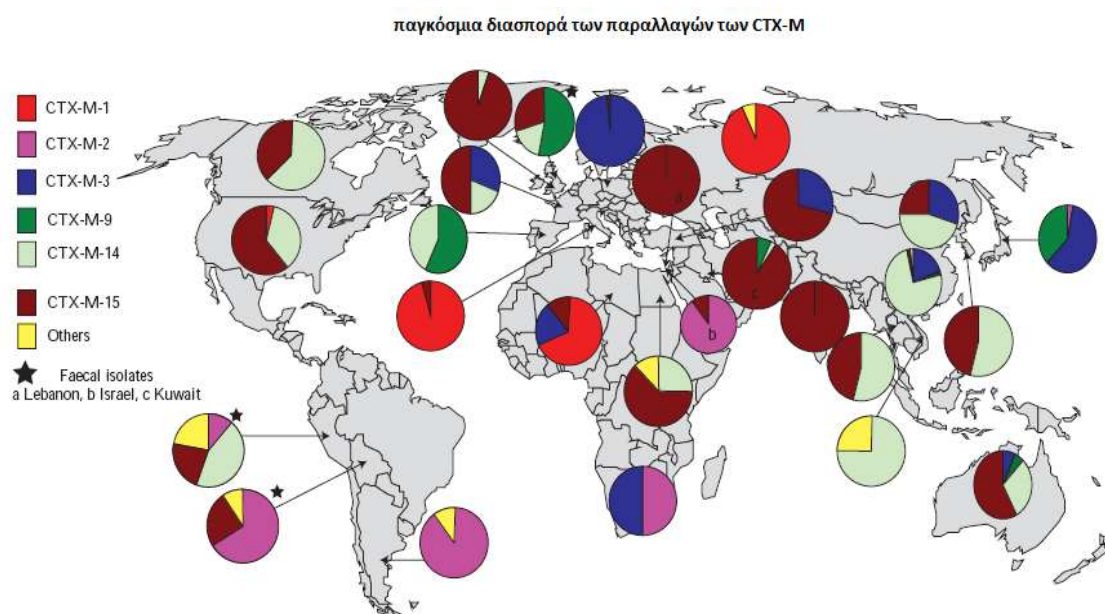
και αναστέλλονται ισχυρότερα από την ταζοβακτάμη απ' ό,τι από το κλαβουλανικό και την σουλμπακτάμη. Βακτήρια που παράγουν CTX-M β-λακταμάσες είναι ανθεκτικά στην κεφταξίμη, ενώ συχνά εμφανίζονται να είναι ευαίσθητα στην κεφταζιδίμη *in vitro*. Επίσης, οι περισσότερες από τις CTX-Ms υδρολύουν αποτελεσματικά την κεφεπίμη [350]. Ανάλυση της δομής τους έδειξε ότι το ενεργό τους κέντρο δεν είναι αρκετά μεγάλο ώστε να αναγνωρίζει αποτελεσματικά την κεφταζιδίμη, το μόριο της οποίας είναι πολύ μεγαλύτερο της κεφταξίμης. Παρόλα αυτά, κάποιες αμινοξικές υποκαταστάσεις βελτιώνουν την υδρολυτική τους δράση έναντι της κεφταζιδίμης, όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση γλυκίνης από ασπαρτικό στη θέση 240 [351].

Πρώτη περιγραφή ενζύμου CTX-M αφορούσε ένα ανθεκτικό σε κεφταξίμη κλινικό στέλεχος *E.coli*, που απομονώθηκε στη Γερμανία το 1989 και ονομάστηκε CTX-M-1 (CefoTaXimase-Munich-1) [333]. Η αλληλούχιση αυτών των ενζύμων δείχνει ότι εμφανίζουν 40% ή λιγότερο ομοιότητα με τα ένζυμα TEM και SHV. Η προέλευση των CTX-M διαφέρει από εκείνη των TEM- και SHV- ESBLs. Ενώ οι TEM- και SHV-ESBLs είναι παραλλαγές που προκύπτουν με σημειακές μεταλλάξεις και αντικαταστάσεις αμινοξέων των πατρικών ενζύμων τους, οι CTX-Ms φαίνεται ότι μεταφέρθηκαν στα παθογόνα κλινικά στελέχη μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, που βρίσκονταν σε μεταθετά γενετικά στοιχεία (HGT). Η αλληλούχισή τους έδειξε υψηλή ομολογία με τις χρωμοσωματικές β-λακταμάσες των *Kluyvera* spp, εντεροβακτηριακών που βρίσκονται στο περιβάλλον και προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις [334].

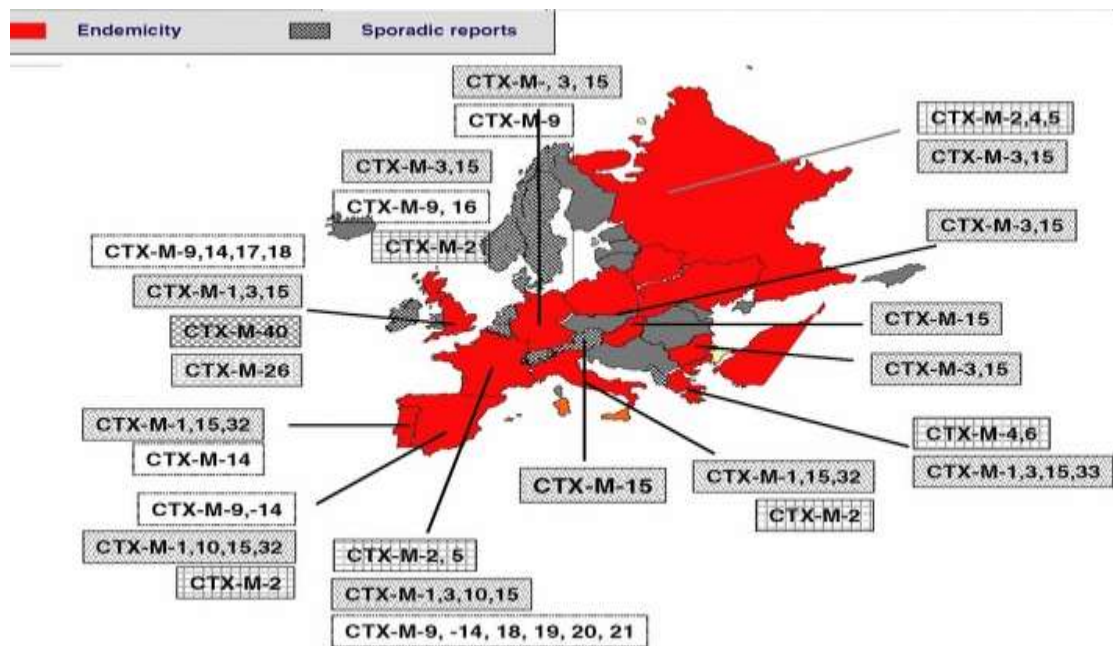
Οι CTX-Ms βρίσκονται σε τουλάχιστον 26 είδη βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Providencia* spp, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Shigella* spp, *S.marcescens*. Τουλάχιστον 166 μέλη έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, είναι όλα ESBLs και κατατάσσονται σε επτά υποτάξεις με βάση την φυλογενετική τους προέλευση: i) σύμπλεγμα CTX-M-3 ii) σύμπλεγμα CTX-M-14 iii) σύμπλεγμα CTX-M-2 iv) σύμπλεγμα CTX-M-25 v) σύμπλεγμα CTX-M-8 vi) σύμπλεγμα CTX-M-64 και vii) σύμπλεγμα CTX-M-4. Κάθε σύμπλεγμα ονομάστηκε από το μέλος που περιγράφηκε πρώτο και περιλαμβάνει

αλληλόμορφες παραλλαγές που διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα ή λίγα κατάλοιπα αμινοξέων [335].

Στις ΗΠΑ , η συχνότητα απομόνωσης των CTX-Ms μεταξύ των στελεχών που παρήγαγαν ESBLs ήταν σχεδόν μηδενική τη δεκαετία του 1990 και εκτινάχθηκε από το 25% στις αρχές του 2000 στο 90% στα τέλη της πρώτης δεκαετίας. Και στην Ευρώπη , οι CTX-Ms άρχισαν να απομονώνονται όλο και συχνότερα εκτοπίζοντας σχεδόν τις άλλες οικογένειες των ESBLs. Το ίδιο φαινόμενο άρχισε τα τελευταία 10 χρόνια να παρατηρείται στην Κίνα , την Ινδία και σε χώρες της Ν.Α. Ασίας και της Αφρικής . Χαρακτηριστικό είναι ότι οι CTX-Ms κυριαρχούν σε λοιμώξεις κοινότητας εγείροντας την υπόθεση ότι δεν ξεκίνησαν σαν νοσοκομειακά στελέχη που έχουν διασπαρεί στην κοινότητα, αλλά ότι ακολούθηθηκε η αντίστροφη πορεία [337,352]. Οι CTX-M-15 και CTX-M-14 είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες παραλλαγές ανά τον κόσμο ακολουθούμενες σε συχνότητα από τις CTX-M-2, CTX-M-3 και CTX-M-1. Στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης ,στη Βόρεια Αμερική ,στη Μέση Ανατολή και την Ινδία φαίνεται ότι επικρατεί ο τύπος CTX-M-15. Στην Κίνα, τη Ν.Α. Ασία και την Ισπανία συχνά απομονώνεται ο CTX-M-14, ενώ ο CTX-M-2 επικρατεί στη Λατινική Αμερική, την Ιαπωνία και το Ισραήλ. Στην Ελλάδα φαίνεται ότι επικρατούν οι παραλλαγές CTX-M-15 και CTX-M-3(εικόνες 42,43)[214-231,335-342].



εικόνα 42: οι CTX-M β-λακταμάσες ανιχνεύονται σε κάθε κατοικημένη ήπειρο. Επικρατούντες τύποι είναι ο CTX-M-15 και ο CTX-M-14. Εικόνα από [343].



εικόνα 43: διασπορά των CTX-M β-λακταμασών στις χώρες της Ευρώπης. Επικρατούν οι τύποι CTX-M-15 και CTX-M-3 και ακολουθεί ο τύπος CTX-M-9. Εικόνα από [353]

Η παγκόσμια διασπορά των CTX-M β-λακταμασών οφείλεται τόσο στην ποικιλία των πλασμιδίων και των μεταθετών γενετικών στοιχείων όσο και στην επικράτηση επιτυχημένων κλώνων. Ειδικότερα, η μεγάλης κλινικής σημασίας και παγκοσμίως διαδεδομένη CTX-M-15, που προκύπτει με σημειακή μετάλλαξη από την CTX-M-3, είναι η ESBL που παράγεται συχνότερα από στελέχη *E.coli* και συσχετίζεται ισχυρά με τον κλώνο ST131. Ο κλώνος ST131 έχει παγκόσμια διασπορά και προκαλεί πολυανθεκτικές λοιμώξεις ουροποιητικού, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και βακτηριαιμίες τόσο κοινότητας (CAIs) όσο και νοσοκομειακές (HAIs). Μελέτες έδειξαν ότι αυτός ο κλώνος, στις αρχές του 2000, σχετιζόταν κυρίως με αντοχή στις κινολόνες, προς τα τέλη, όμως, της πρώτης δεκαετίας άρχισε να συσχετίζεται ισχυρά και με την παραγωγή CTX-M-15. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ο ST131 αντιπροσωπεύει το 60-80% των ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών *E.coli* και των 50-60% των στελεχών *E.coli*, που είναι παραγωγείς ESBL. Η επικράτηση του κλώνου ST131 στην κοινότητα και στο περιβάλλον (ζώα, επιφανειακά ύδατα) φαίνεται ότι σχετίζεται με την υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών (εικόνα 44)[343-349]. Τα γονίδια των CTX-Ms βρίσκονται σε πλασμίδια που συχνά μεταφέρουν και άλλα γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά, όπως για παράδειγμα στις αμινογλυκοσίδες, φθοριοκινολόνες, τετρακυκλίνες ή σουλφοναμίδες [347].

Global dissemination of Escherichia coli ST131 clone (2013).



Marie-Hélène Nicolas-Chanoine et al. Clin. Microbiol. Rev. 2014;27:643-674

εικόνα 44: παγκόσμια διασπορά του *E.coli* ST131. Ο κλώνος αυτός έχει παίξει σημαντικό ρόλο στη διάδοση της CTX-M-15, αλλά σποραδικά μεταφέρει κι άλλες CTX-Ms.

6.4 OXA-ESBLs

Οι οξακιλλινάσες αποτελούν μια οικογένεια β-λακταμασών που αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα. Έχουν ενεργό κέντρο σερίνης, υδρολύουν την οξακιλλίνη, γιαυτό και χαρακτηρίζονται με το πρόθεμα OXA και κατατάσσονται στην τάξη D κατά Ambler ή στην ομάδα 2d κατά Bush –Jacoby. Είναι ως επί το πλείστον πλασμιδιακές β-λακταμάσες που παράγονται από gram-αρνητικά βακτήρια και έχουν στενό υδρολυτικό φάσμα [310]. Στις αρχές του 1990, ανακαλύφθηκε σε νοσοκομείο της Άγκυρας στην Τουρκία, μία οξακιλλινάση σε στέλεχος *P.aeruginosa* που είχε ευρύτερη υδρολυτική δραστηριότητα. Μπορούσε να υδρολύει ασθενώς την κεφτοαξίμη, την κεφτριαξόνη και την αζτρεονάμη. Ήταν η πρώτη OXA-ESBL που περιγράφηκε, προέκυψε από την OXA-10 με υποκατάσταση 2 αμινοξέων (αντικατάσταση αργινίνης από σερίνη στη θέση 143 και γλυκίνης από ασπαρτικό στη θέση 157) και ονομάστηκε OXA-11 [311]. Με σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της OXA-10 έχουν προκύψει οι περισσότερες από τις λοιπές OXA-ESBLs. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 18 OXA-ESBLs. Παράγονται κυρίως σε στελέχη *P. aeruginosa* και προσδίδουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην κεφταζιδίμη. Σπανίως ανευρίσκονται και σε άλλα είδη, πχ η OXA-21 εντοπίστηκε σε στέλεχος *A.baumannii* [355].

6.5 άλλες εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες

Β-λακταμάσες που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και δεν αποτελούν παραλλαγές των ήδη γνωστών τύπων ESBLs απομονώνονται τα τελευταία χρόνια σε αρκετά είδη gram-αρνητικών βακτηρίων. Πρόκειται για τις πιο σπάνιες οικογένειες ESBLs : PER, VEB, BEL, TLA, GES, SFO-1, BES-1. Οι περισσότερες είναι πλασμιδιακές.

PER-ESBLs: Η PER-1 ανακαλύφθηκε το 1993 σε στέλεχος *P.aeruginosa* που απομονώθηκε από Τούρκο ασθενή που νοσηλευόταν στη Γαλλία [356]. Είναι ευρέως διαδεδομένη σε *Acinetobacter* spp. και *P. aeruginosa* στην Τουρκία, αλλά έχει απομονωθεί σε στελέχη αυτών και σε άλλες χώρες όπως Ιταλία, Γαλλία, Βέλγιο, Ιαπωνία και Κορέα. Πρόσφατα εντοπίστηκε και στην Ελλάδα [357,358,403]. Η PER-1 έχει εντοπιστεί και σε άλλα είδη εντεροβακτηριακών, όπως πχ *P.stuartii* και *P.mirabilis* [359]. Το 1996 ανακαλύφθηκε η PER-2, που έχει 86% αμινοξέων ομολογία με PER-1. Εντοπίζεται σε στελέχη *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *V.cholerae* και πρόσφατα *A. baumannii* [375]. Ανιχνεύεται συχνότερα σε χώρες της Λατινικής Αμερικής [360]. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 8 μέλη [361,375]. Οι PER-ESBLs προσδίδουν αντοχή σε πενικιλίνες, κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη και αναστέλλονται από κλαβουλανικό και την ταζοβακτάμη [362].

VEB- ESBLs: Η VEB-1 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1996 σε στέλεχος *E. coli* που απομονώθηκε από έναν ασθενή στο Βιετνάμ. Η οικογένεια των VEB-ESBLs περιλαμβάνει μέχρι σήμερα 16 μέλη, εκ των οποίων τα 4 ανακαλύφθηκαν πρόσφατως. Η συχνότητα εμφάνισης τους αυξάνει τα τελευταία χρόνια [363]. Παρέχουν αντοχή στην κεφταζιδίμη, την κεφοταξίμη και την αζτρεονάμη και αναστέλλονται ισχυρά από το κλαβουλανικό, τη σουλμπακτάμη, την ταζοβακτάμη και την αβιβακτάμη [364]. Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες στην Ταϊλάνδη και το Βιετνάμ φανερώνουν τη μεγάλη διασπορά της VEB-1, καθώς στις χώρες αυτές περίπου το 40% των ανθεκτικών *Enterobacteriaceae* και το 80% των ανθεκτικών *P. aeruginosa* στην κεφταζιδίμη ήταν παραγωγείς VEB-1 [365]. Οι VEB-ESBLs έχουν εντοπιστεί και σε στελέχη *A. baumannii* [366]. Στελέχη που παράγουν VEB απομονώνονται και στην Ευρώπη. Πολύ συχνά, τα γονίδια για τις VEB εδράζονται σε πλασμίδια που μεταφέρουν και γονίδια αντοχής για τις κινολόνες [367].

BEL-ESBLs: Η BEL-1 εντοπίστηκε σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στο Βέλγιο το 2004. Το γονίδιο της BEL-1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα και είναι ενσωματωμένο σε ιντεγκρόνιο τάξης 1, που φέρει κι άλλα γονίδια αντοχής. Σχετικά πρόσφατα αναγνωρίστηκε η BEL-2, που προκύπτει με υποκατάσταση ενός αμινοξέος. Υπάρχει αναφορά και για τρίτο μέλος, τη BEL-3, σε *P. aeruginosa*. Υδρολύουν ισχυρά τις κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη, ενώ αναστέλλονται καλύτερα από το κλαβουλανικό παρά από την ταζοβακτάμη [368,376].

TLA-ESBLs: Η TLA-1 εντοπίστηκε σε στέλεχος *E.coli* που απομονώθηκε από ασθενή στο Μεξικό το 1993. Υδρολύει αποτελεσματικά τις κεφαλοσπορίνες (όχι όμως την κεφοξιτίνη), την κεφεπίμη και την αζτρεονάμη. Αναστέλλεται έντονα από την ταζοβακτάμη και σε μικρότερο βαθμό από το κλαβουλανικό [372]. Η TLA-2 είναι μια νέα ESBL, που κωδικοποιείται σε ένα 47-kb πλασμίδιο απροσδιόριστου βακτηριακού στελέχους που βρέθηκε σε ίλυ μονάδας επεξεργασίας λυμάτων στη Γερμανία το 2002 [373]. Πρόσφατα, στην οικογένεια των TLA-ESBLs προστέθηκε η TLA-3 που εντοπίστηκε σε κλινικό στέλεχος *S. marcescens* στην Ιαπωνία [374].

GES: Τα ένζυμα της οικογένειας GES είναι 27, μεταξύ των οποίων κάποια είναι καρβαπενεμάσες. Η GES-1 πρώτη φορά εντοπίστηκε σε στέλεχος *K. pneumoniae* από νεογνό στη Γαλλία. Είναι ESBL, δηλαδή υδρολύει κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος και αναστέλλεται από το κλαβουλανικό και την ταζοβακτάμη. Παρουσιάζει όμως μειωμένη δράση έναντι της αζτρεονάμης [369].

SFO-1: Βρέθηκε σε ένα και μόνο κλινικό στέλεχος *E. cloacae* στην Ιαπωνία το 1988. Η SFO-1 είναι ESBL που υδρολύει την κεφταξίμη πολύ αποτελεσματικά, ενώ την κεφταζιδίμη πτωχά. Η δραστηριότητα της αναστέλλεται από το κλαβουλανικό. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί φέρεται σε πλασμίδιο που επίσης μεταφέρει το γονίδιο *ampR*, που ρυθμίζει την επαγωγή της AmpC-β-λακταμάσης [370].

BES-1: Απομονώθηκε από ένα και μόνο κλινικό στέλεχος *S. marcescens* το 1996 στη Βραζιλία. Η BES-1 είναι πλασμιδιακή ESBL που υδρολύει πολύ καλύτερα την κεφταξίμη και την αζτρεονάμη απ' ό,τι την κεφταζιδίμη. Πάντως, συγκριτικά με τις CTX-M έχει καλύτερη υδρολυτική δράση έναντι της κεφταζιδίμης. Αναστέλλεται ισχυρά από το κλαβουλανικό, ενώ πτωχά από την ταζοβακτάμη [371].

7. εργαστηριακή διάγνωση των ESBLs

7.1 συμβατική εργαστηριακή διάγνωση

Η εργαστηριακή αναζήτηση των ESBLs είναι περίπλοκη. Στην καθημέρα κλινική διαγνωστική πράξη, η ανίχνευση των στελεχών που παράγουν ESBLs γίνεται ως επί το πλείστον με φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης (phenotypic confirmatory tests), εφόσον έχει προηγηθεί ο αρχικός έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά. Δηλαδή, στέλεχος που φαίνεται ότι είναι *in vitro* ανθεκτικό κατά την αρχική διαλογή ευαισθησίας και ύποπτο για την παραγωγή ESBL, στη συνέχεια ελέγχεται με τις φαινοτυπικές επιβεβαιωτικές δοκιμασίες. Η εντόπιση της παραγωγής ESBLs περιλαμβάνει τα δύο αυτά σημαντικά βήματα [330,377,378].

Ο αρχικός έλεγχος της ευαισθησίας ενός βακτηρίου στα αντιβιοτικά γίνεται με:

- α) τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby-Bauer)
- β) τον προσδιορισμό της MIC. Η MIC (Minimum Inhibitory Concentration) είναι η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού, δηλαδή η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την *in vitro* ανάπτυξη του βακτηρίου. Η MIC προσδιορίζεται είτε με έτοιμα συστήματα προσδιορισμού (χειροποίητα πχ E-test, ημιαυτόματα ή αυτοματοποιημένα) είτε με τη μέθοδο αραιώσεων σε ζωμό (broth dilution method) ή σε άγαρ (agar dilution method).

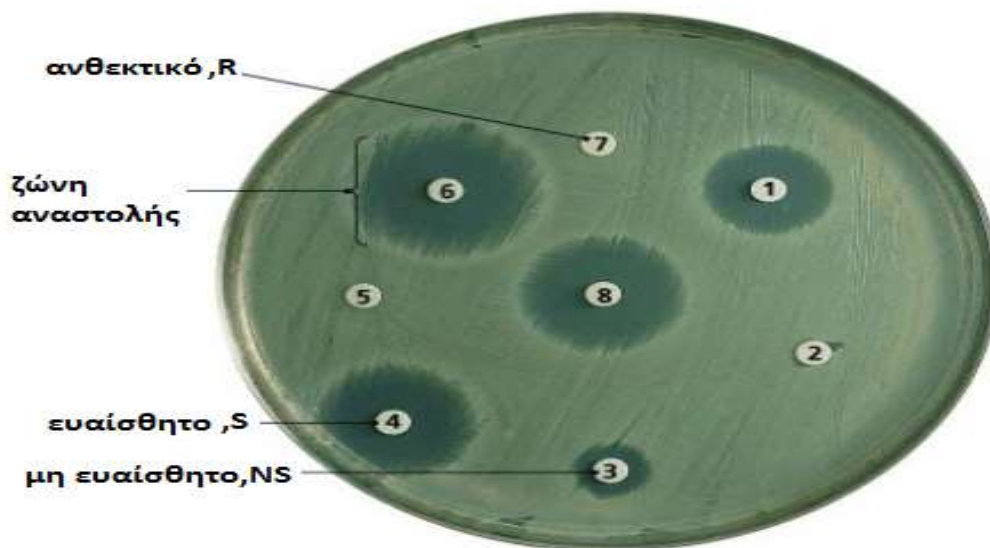
μέθοδος Kirby-Bauer: Η υποψία ότι ένα βακτηριακό στέλεχος είναι πιθανόν να παράγει ESBL τίθεται όταν κατά τον αρχικό έλεγχο ευαισθησίας με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ παρουσιάζει *in vitro* αντοχή σε μία κεφαλοσπορίνη -δείκτη. Συνήθως ως δείκτης χρησιμοποιείται η κεφποδοξίμη, μια τρίτης γενεάς κεφαλοσπορίνη, που υδρολύεται από τις TEM-, SHV-, OXA- ESBLs και CTX-Ms [388]. Άλλα αντιβιοτικά - δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αξιολόγηση είναι η κεφταζιδίμη, η κεφτριαξόνη, η κεφοταξίμη, η κεφτιζοξίμη και η αζτρεονάμη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συγγένεια των ESBLs για διαφορετικά υποστρώματα ποικίλλει, η χρήση περισσότερων του ενός από αυτά τα αντιβιοτικά για τον αρχικό έλεγχο βελτιώνει την ευαισθησία της ανίχνευσης. Αν το υπό εξέταση στέλεχος εμφανίζει αντίσταση ή μειωμένη ευαισθησία σε οποιοδήποτε από αυτά τα

αντιβιοτικά-δείκτες ,τίθεται η υποψία για την παραγωγή ESBL και πρέπει να ακολουθήσει φαινοτυπική επιβεβαιωτική δοκιμασία (εικόνα 45).

Για την αρχική αυτή διαλογή , συγκεκριμένα το CLSI προτείνει να χαρακτηρίζεται ένα στέλεχος ως μη ευαίσθητο (Non susceptible,NS), όταν η ζώνη αναστολής είναι μικρότερη ή ίση των 17 mm (≤ 17 mm) στο δίσκο κεφεπίμης 30μg, ≤ 20 mm στους δίσκους κεφποδοξίμης 10μg , κεφταζιδίμης 30μg και αζτρεονάμης 30μg , ≤ 22 mm στο δίσκο κεφτριαξόνης 30μg, ≤ 25 mm στο δίσκο κεφοταξίμης 30μg και συνιστά τη διεξαγωγή φαινοτυπικής δοκιμασίας για την επιβεβαίωση της παραγωγής ESBLs. Οι οδηγίες αυτές του CLSI εφαρμόζονται μόνο για *Klebsiella* sp, *E.coli* και *P.mirabilis* [377,378]. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή επιτροπή EUCAST, για να χαρακτηριστεί ένα εντεροβακτηριακό στέλεχος μη ευαίσθητο, οι ζώνες αναστολής πρέπει να είναι < 20 mm στο δίσκο κεφοταξίμης 5 μg, < 21 mm στο δίσκο κεφποδοξίμης 10 μg, < 22 mm κεφταζιδίμης 10 μg , <25 mm στο δίσκο κεφτριαξόνης 30 μg, <26 mm στο δίσκο αζτρεονάμης 30 μg και < 27 mm στο δίσκο κεφεπίμης 30 μg (πίνακας 6) [390].

	α) ζώνη αναστολής [NS]		β) MIC (μg/ml) [S]	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
κεφοταξίμη	$\leq 25\text{mm}$ (30μg)	<20mm (5 μg)	≤ 1	≤ 1
κεφτριαξόνη	$\leq 22\text{mm}$ (30μg)	<25mm (30 μg)	≤ 1	≤ 1
κεφταζιδίμη	$\leq 20\text{mm}$ (30μg)	<22mm (10 μg)	≤ 4	≤ 1
κεφεπίμη	$\leq 17\text{mm}$ (30μg)	<27mm (30 μg)	≤ 2	≤ 1
αζτρεονάμη	$\leq 20\text{mm}$ (30μg)	<26mm (30 μg)	≤ 4	≤ 1
κεφποδοξίμη	$\leq 20\text{mm}$ (10μg)	<21mm (10 μg)	≤ 4	≤ 1

πίνακας 6: αντίστοιχα κατά CLSI (2010,2014) και EUCAST (2017): (α) τιμές διαμέτρου της ζώνης αναστολής ,ώστε να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος μη ευαίσθητο [NS] και να ακολουθήσει στη συνέχεια φαινοτυπικός έλεγχος. Τα αντιβιοτικά δεν είναι της ίδιας συγκέντρωσης, πχ η κεφοταξίμη στο CLSI είναι 30μg και στην EUCAST είναι των 5 μg. Επίσης, στο CLSI οι εκτιμήσεις αφορούν \leq , ενώ στην EUCAST < (β) τα breakpoints κάτω από τα οποία το στέλεχος θεωρείται ευαίσθητο [S] .Τιμές πάνω από τα breakpoints είναι ενδεικτικές παραγωγής ESBLs



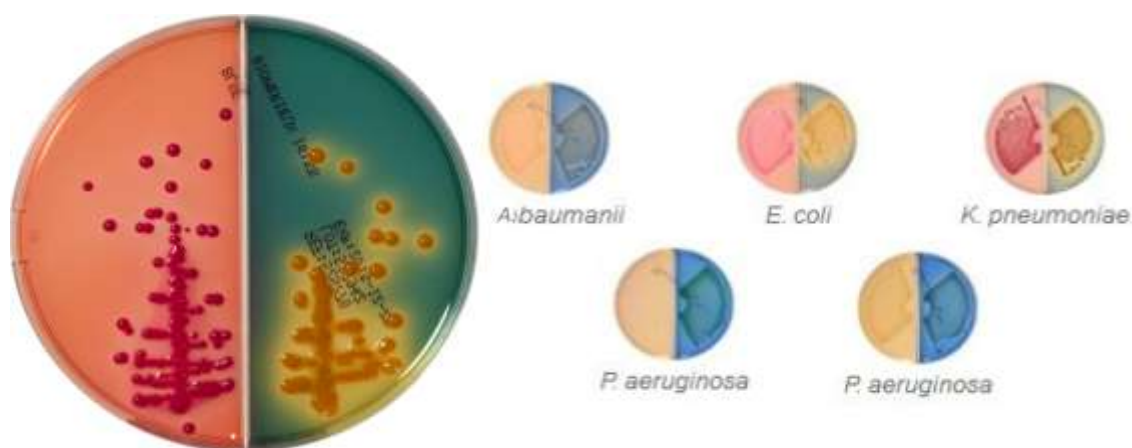
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

εικόνα 45: μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby-Bauer disk diffusion test)

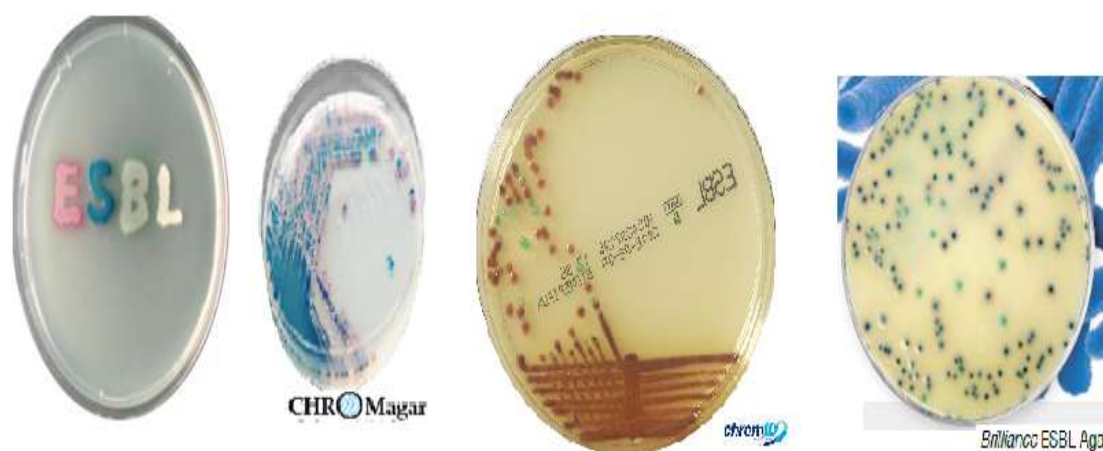
προσδιορισμός της MIC: Με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων σε άγαρ, εκτιμάται η δυνατότητα ανάπτυξης του βακτηρίου σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών - δεικτών. Ανάπτυξη του εξεταζόμενου βακτηρίου σε αυτές τις προκαθορισμένες συγκεντρώσεις ή και σε μεγαλύτερες θέτει την υπόνοια παραγωγής ESBL, που μπορεί να επιβεβαιωθεί με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες. Το CLSI αναθεώρησε τα όρια (breakpoints) και επί υπέρβασή τους, δεν θεωρεί απαραίτητη τη φαινοτυπική επιβεβαίωση για την παραγωγή των ESBLs και οι MICs δίνονται στον κλινικό ως έχουν, χωρίς να τροποποιούνται. Συγκεκριμένα, τα νέα όρια ευαισθησίας είναι το 1μg/ml για κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφαζολίνη, κεφτιζοξίμη και τα 4μg/ml για κεφταζιδίμη και αζτρεονάμη. Τον Ιανουάριο του 2014 αναθεωρήθηκαν εκ νέου τα όρια για την κεφεπίμη, τα οποία πια είναι τα 2μg/ml [389]. Τα αντίστοιχα όρια στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά σύμφωνα με την EUCAST είναι το 1 μg/ml (πίνακας 6). Επομένως, σε ανάπτυξη βακτηρίου σε μεγαλύτερες των breakpoint τιμών τίθεται η υπόνοια παραγωγής ESBL. Δεν είναι απαραίτητο να γίνεται επιβεβαίωση με φαινοτυπικό έλεγχο παρά μόνο για επιδημιολογικούς σκοπούς και για τη λήψη μέτρων ελέγχου λοιμώξεων [390].

Η απλούστερη μέθοδος για την άμεση ταυτοποίηση των στελεχών που παράγουν ESBLs είναι η χρήση εκλεκτικού μέσου καλλιέργειας (άγαρ MacConkey, άγαρ Drigalski), στο οποίο έχει προστεθεί κεφαλοσπορίνη ευρέος φάσματος όπως

κεφοταξίμη ή κεφταζιδίμη. Διαθέσιμα στο εμπόριο είναι τα BLSE άγαρ (bioMérieux, Γαλλία) , EbSA ESBL άγαρ (AlphaOmega BV, Ολλανδία) (εικόνα 45). Τα χρωμογόνα θρεπτικά υλικά αποτελούν μια σύγχρονη απάντηση στο αίτημα της πιο εύκολης και πιο γρήγορης ανίχνευσης των στελεχών που παράγουν ESBL, καθώς μπορούν να συνδυάσουν την ταυτοποίηση του στελέχους και την ταυτόχρονη ανίχνευση της παραγωγής ESBL. Εκτός από την προσθήκη αντιβιοτικών που εμποδίζουν την ανάπτυξη εκείνων των βακτηρίων που δεν είναι παραγωγείς ESBLs , σε αυτά τα θρεπτικά υλικά έχουν επιπλέον προστεθεί χρωμογόνα υποστρώματα, οπότε οι αποικίες των στελεχών που παράγουν ESBLs χρωματίζονται διαφορετικά ανά είδος βακτηρίου. Επί του παρόντος, διαθέσιμα στο εμπόριο χρωμογόνα θρεπτικά μέσα είναι τα chromID ESBL (bioMérieux, Γαλλία) , Brilliance ESBL (Oxoid Ltd., Ηνωμένο Βασίλειο) και CHROMagar ESBL (CHROMagar, Γαλλία) (εικόνα 46) [391-394].



εικόνα 45: το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό BLSE άγαρ. Σε αυτό αναπτύσσονται στελέχη που παράγουν ESBLs.



εικόνα 46: χρωμογόνα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά. Σε αυτά αναπτύσσονται στελέχη που παράγουν ESBLs και οι αποικίες χρωματίζονται με συγκεκριμένο χρώμα ανά γένος.

Ακόμη και στην περίπτωση της χρήσης των εκλεκτικών θρεπτικών υλικών , χωρίς ή με προσθήκη χρωμογόνων ουσιών , η ανίχνευση στελεχών που παράγουν ESB� πρέπει να επιβεβαιώνεται με φαινοτυπικές δοκιμασίες .

Στο δεύτερο βήμα της αναζήτησης των ESB�s, χρησιμοποιούνται δοκιμασίες που στηρίζονται στο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των ενζύμων να αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Οπότε , για την επιβεβαίωση της παραγωγής ESB� από το εξεταζόμενο ανθεκτικό στέλεχος θα πρέπει να αποδειχτεί η συνέργεια μεταξύ μιας οξυ-ιμινο-κεφαλοσπορίνης και του κλαβουλανικού οξέος. Κατά αυτόν τον τρόπο διακρίνονται τα στελέχη που παράγουν ESB�s από εκείνα που είναι ανθεκτικά για άλλους λόγους. Μερικές από τις επιβεβαιωτικές φαινοτυπικές μέθοδοι είναι :

1) δοκιμασία διπλής συνέργειας (Double Disk Synergy Test, DDST). Σε Mueller-Hinton άγαρ (MH) που έχει ενοφθαλμιστεί με εναιώρημα του εξεταζόμενου βακτηρίου τοποθετούνται δίσκοι οξυ-ιμινοκεφαλοσπορινών στα 30 mm από ένα δίσκο με το συνδυασμό αμοξυκιλλίνης και κλαβουλανικού. Όταν υπάρχει παραγωγή ESB�, στη περιοχή ανάμεσα στο δίσκο της κεφαλοσπορίνης και στο δίσκο του συνδυασμού παρατηρείται διεύρυνση της ζώνης αναστολής. Η μείωση της απόστασης στα 20mm βελτιώνει την ευαισθησία του τεστ [330,377,381].



2) Δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (Combined Disk Test, CDT). Δίσκοι οξυ-ιμινο-κεφαλοσπορίνης με και χωρίς κλαβουλανικό τοποθετούνται σε MH άγαρ, που έχει εμβολιαστεί με το εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου. Αύξηση της διαμέτρου γύρω από το συνδυασμένο δίσκο >5mm συγκριτικά με τη διάμετρο ζώνης αναστολής της σκέτης κεφαλοσπορίνης είναι ενδεικτική της παραγωγής

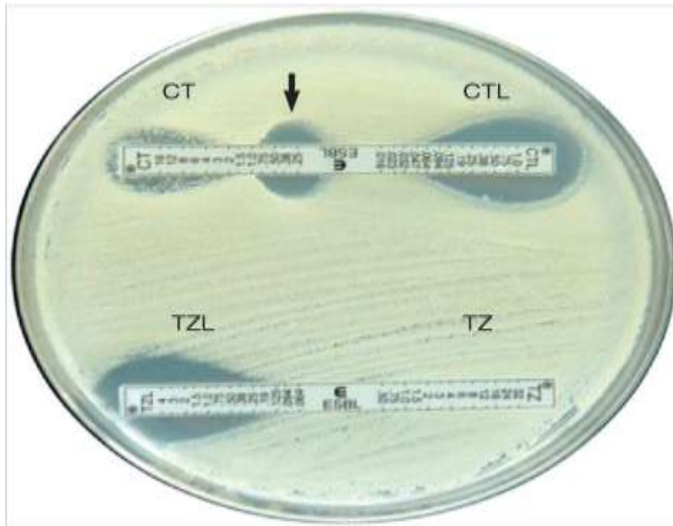
ESBL. Είναι η προτεινόμενη από τη CLSI φαινοτυπική δοκιμασία επιβεβαίωσης (CLSI ESBL Confirmatory Test, 2000) που εφαρμόζεται σε *E.coli*, *Klebsiella spp*, *P.mirabilis* και χρησιμοποιεί δίσκους κεφταζιδίμης και κεφοταξίμης 30μg χωρίς ή με κλαβουλανικό 10μg. Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε στελέχη που φέρουν AmpC-β-λακταμάση ή καρβαπενεμάσες (εικόνα 47) [378].



Εικόνα 47: Δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων. Είναι η προτεινόμενη μέθοδος από το CLSI .

Στις μέρες μας είναι διαθέσιμα στο εμπόριο έτοιμα εργαλεία προσδιορισμού MIC και ανίχνευσης των ESBL-στελεχών όπως:

α) το ESBL-E test με τη χρήση έτοιμης ειδικής ταινίας , στο κάθε άκρο της οποίας περιέχεται κεφεπίμη ή οξυ-ιμινο-κεφαλοσπορίνη πχ κεφταζιδίμη, κεφοταξίμη σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις (15 συγκεντρώσεις). Το ESBL-E test με κεφεπίμη ανιχνεύει την παραγωγή ESBLs παρουσία AmpC-β- λακταμασών .Στο ένα από τα δυο άκρα περιέχεται επίσης κλαβουλανικό οξύ σε σταθερή συγκέντρωση 4μg/ml . Η MIC προσδιορίζεται από το σημείο όπου η έλλειψη συναντά την ταινία. Το πηλίκο των MICs της κεφαλοσπορίνης προς το συνδυασμό με κλαβουλανικό >8 είναι ενδεικτικό παραγωγής ESBLs. Το τεστ θεωρείται επίσης θετικό όταν παρατηρείται διεύρυνση της ζώνης αναστολής (ζώνη φάντασμα, phantom zone) στις χαμηλές συγκεντρώσεις του σκέτου αντιβιοτικού (λόγω της διάχυσης του κλαβουλανικού) ή όταν υπάρχει ελλειπτική παραμόρφωση στο κωνικό τελείωμα. Οι ταινίες αυτές είναι χρήσιμες και για τον αρχικό έλεγχο ευαισθησίας και για την επιβεβαίωση. Η δοκιμασία ESBL-E test , όμως, απαιτεί καλή εκπαίδευση και εμπειρία (εικόνα 48) [330].

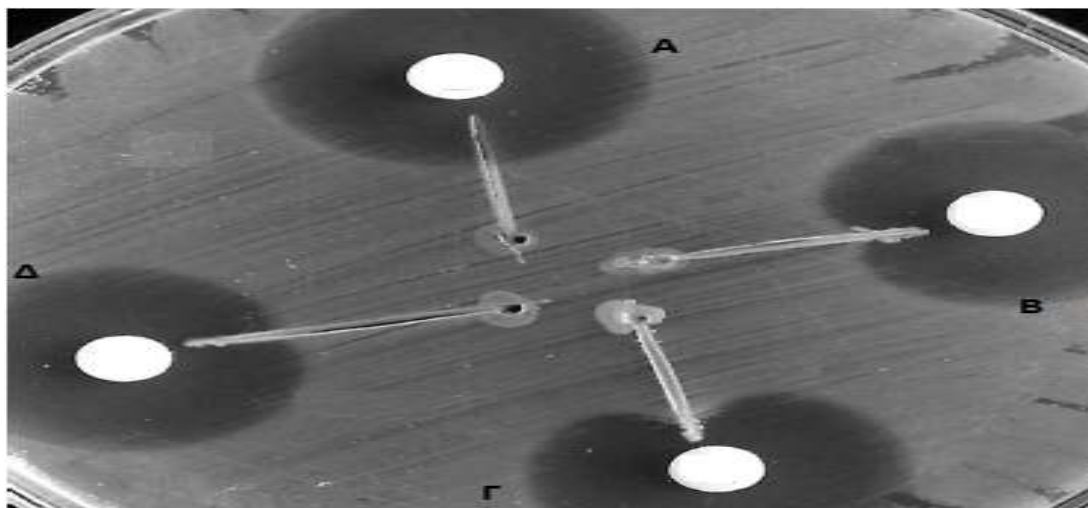


εικόνα 48: ESBL-E test. Το τεστ θεωρείται, επίσης, θετικό όταν παρατηρείται phantom zone στις χαμηλές συγκεντρώσεις της σκέτης κεφαλοσπορίνης .εικόνα από [395].

β) τα αυτοματοποιημένα μηχανήματα με τη χρήση με ειδικών καρτών. Αυτά είναι τα: Vitek 2 ESBL-test (bioMerieux Vitek, Hazelton, Missouri), MicroScan ESBL-plus panels (Dade Behring, Sacramento,CA), BD Phoenix Automated Microbiology System (Sparks, Md).Το Vitek 2 ESBL-test είναι μέθοδος μικροαραιώσεων με κάρτες που διαθέτουν μικροϋποδοχείς με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις οξυ-ιμινοκεφαλοσπορινών και κεφεπίμης χωρίς ή με συνδυασμό με κλαβουλανικό .Το σύστημα MicroScan ESBL-plus panels έχει έτοιμες πλάκες μικροτιτλοποίησης για ταυτοποίηση και προσδιορισμό MIC. Το BD Phoenix ESBL είναι μικρομέθοδος που χρησιμοποιεί την απόκριση της ανάπτυξης του βακτηρίου σε κεφποδοξίμη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη και κεφοταξίμη, με ή χωρίς κλαβουλανικό οξύ, για να ανιχνευθεί η παραγωγή ESBLs .Η επίδοσή τους διαφέρει αναλόγως του είδους των εξεταζόμενων στελεχών, με ευαισθησία να κυμαίνεται από 80-99% ,αλλά σχετικά χαμηλή ειδικότητα (50-80%) [330,379,396,397].



Άλλες φαινοτυπικές μέθοδοι για την επιβεβαίωση της παραγωγής των ESBLs είναι: i) το τεστ τριών διαστάσεων, το οποίο δεν στηρίζεται στο γνώρισμα των ESBLs να αναστέλλονται από το κλαβουλανικό. Το MH άγαρ εμβολιάζεται με το εναιώρημα ευαίσθητου στελέχους ή του *E.coli* ATCC25922 ή του εξεταζόμενου βακτηρίου. Στη συνέχεια δημιουργείται μια οπή και χαράσσεται και μια σχισμή στο οποίο ενοφθαλμίζεται πυκνό βακτηριακό εναιώρημα του εξεταζόμενου στελέχους. Δίσκοι κεφαλοσπορινών τοποθετούνται σε μικρή απόσταση από την οπή. Η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού από τις β-λακταμάσες οπτικοποιείται ως διαταραχή ή ασυνέχεια της ζώνης αναστολής ή και ως εμφανής ανάπτυξη αποικιών στην οπή και στη σχισμή (εικόνα 49).



εικόνα 49: δοκιμασία τριών διαστάσεων. Το A είναι στέλεχος ελέγχου (αρνητικό). Τα στελέχη B, Γ, Δ είναι παραγωγείς ESBLs γιατί παρατηρείται παραμόρφωση της ζώνης αναστολής (στο στέλεχος Δ η παραμόρφωση είναι μικρή).

ii) μέθοδος εμπλουτισμού με κλαβουλανικό. Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με κλαβουλανικό 4μg/ml εμβολιάζεται με το βακτηριακό εναιώρημα και τοποθετούνται δίσκοι κεφαλοσπορινών και αζτρεονάμης. Συγκρίνονται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής με εκείνες που προκύπτουν γύρω από δίσκους των ιδίων αντιβιοτικών που έχουν τοποθετηθεί σε άλλο, εμβολιασμένο με βακτηριακό εναιώρημα, άγαρ MH που δεν είναι όμως εμπλουτισμένο με κλαβουλανικό
iii) μέθοδος συνδυασμένων δίσκων σε Iso-Sensitest άγαρ. Είναι μέθοδος όπου συγκρίνονται οι δίσκοι αντιβιοτικών χωρίς ή με κλαβουλανικό σε Iso-Sensitest άγαρ και όχι MH. Το τεστ δεν μπορεί να ανιχνεύσει παραγωγή SHV-6
iv) μέθοδος

αντικατάστασης δίσκων. Σε ΜΗ άγαρ, που έχει εμβολιαστεί με το βακτηριακό εναιώρημα τοποθετούνται για μία ώρα 3 δίσκοι αμοξυκιλλίνης/κλαβουλανικού ή 3 χάρτινοι δίσκοι μόνο με κλαβουλανικό. Στη συνέχεια αφαιρούνται και στα ίδια σημεία τοποθετούνται δίσκοι κεφοταξίμης, κεφταζιδίμης και αζτρεονάμης. Σε απόσταση από τα σημεία αυτά, δίσκοι με τα ίδια 3 αντιβιοτικά τοποθετούνται ως δίσκοι έλεγχου. Αύξηση >5mm των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους που αντικατέστησαν το κλαβουλανικό σε σύγκριση με εκείνες γύρω από τους δίσκους έλεγχου είναι ενδεικτική παραγωγής ESBLs [330,377].

Έχουν κατά καιρούς προταθεί διάφορες τροποποιήσεις και μικρές προσαρμογές στα φαινοτυπικά τεστ επιβεβαίωσης αποσκοπώντας στη βελτίωση της ευαισθησίας και της ειδικότητάς τους ή και στην επιτάχυνση των αποτελεσμάτων. Τροποποιήσεις που αφορούν, για παράδειγμα, στον αριθμό των δίσκων, στην απόσταση μεταξύ των δίσκων, στην προσθήκη αναστολέων στους δίσκους αντιβιοτικών πχ βορονικού, στη χρήση άλλων υποστρωμάτων πχ κεφεπίμης, στον εμπλουτισμό του ΜΗ άγαρ με αντιβιοτικά πχ κλοξακιλλίνη ή σε αντικατάσταση του ΜΗ άγαρ από χρωμογόνο άγαρ, όπως πχ το Qui-color agar, στο οποίο αρχίζουν να χρωματίζονται οι ζώνες αναστολής στις 4-6 ώρες προτού καν γίνουν ορατές οι αποικίες του εξεταζόμενου βακτηρίου. Αρκετές συγκριτικές μελέτες αναφέρουν ότι, σε γενικές γραμμές η ευαισθησία των φαινοτυπικών αυτών δοκιμασιών για την ανίχνευση της παραγωγής των ESBLs κυμαίνεται από 85% έως 100% και η ειδικότητα από 85% έως 100%, με τη δοκιμασία των συνδυασμένων δίσκων (Combined Disk Test) να έχει την καλύτερη επίδοση. Είναι και η δοκιμασία άλλωστε που συστήνεται από το CLSI, είναι προτυποποιημένη μόνο για στελέχη *E.coli*, *Klebsiella* spp, *P.mirabilis* [330,377,380-386,390-392,398].

7.2 προβλήματα στη φαινοτυπική ανίχνευση της παραγωγής ESBLs

Ο εντοπισμός των βακτηρίων που παράγουν ESBLs είναι μια μεγάλη πρόκληση για τον κλινικό μικροβιολόγο. Παράγοντας που μπορεί να επιπλέξει τη φαινοτυπική ανίχνευση είναι η ταυτόχρονη παραγωγή κι άλλων τύπων β- λακταμασών από το ίδιο στέλεχος. Τα φαινοτυπικά τεστ, αν και γενικά έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, μπορεί στην περίπτωση αυτή να έχουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ψευδώς θετικό αποτέλεσμα μπορεί να

υπάρξει είτε όταν το στέλεχος υπερπαράγει SHV-1 (συνήθως αφορά *E.coli* ή *K.pneumoniae*) είτε όταν πρόκειται για στέλεχος *K.oxytoca* που υπερεκφράζει τη χρωμοσωμιακή β-λακταμάση K1. Ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει όταν το στέλεχος : i) παράγει, επιπλέον των ESBLs, και AmpC-β- λακταμάσες ή καρβαπενεμάσες ii) παράγει CMTs ή IRTs, β-λακταμάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό, ελάχιστα οι CMTs και καθόλου οι IRTs iii) είναι *P.aeruginosa* με μειωμένη έκφραση πορινών, υπερέκφραση αντλιών εκροής ή και παραγωγή MBL.

Μπορούν , επομένως, να χαθούν πολύτιμα επιδημιολογικά δεδομένα ή να δημιουργηθεί σύγχυση όσον αφορά στην εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων. Οι φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης έχουν επιπλέον το μειονέκτημα ότι είναι χρονοβόρες. Χρειάζονται τουλάχιστον ολονύχτια επώαση , που σημαίνει ότι μπορεί να μεσολαβήσουν 24-48 ώρες από τότε που το στέλεχος καλλιεργήθηκε. Αυτό , εκτός από την καθυστερημένη εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, μπορεί να αποτελέσει βαρύνουσα σημασίας πρόβλημα, ιδιαίτερα στην περίπτωση της σήψης και της σηπτικής καταπληξίας , όπου είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση του ασθενούς ο χρόνος έναρξης της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής [402].

7.3 Τεχνικές ταχείας ανίχνευσης της παραγωγής ESBLs

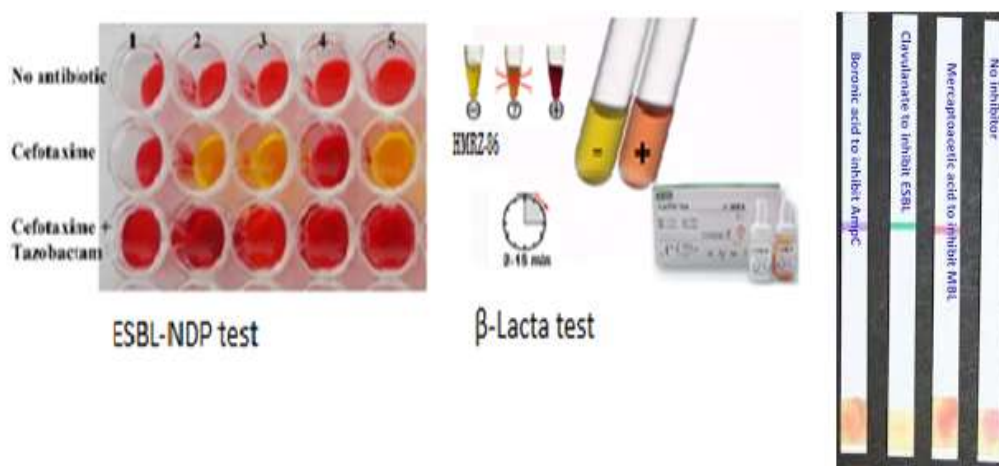
Ένα βιοχημικό τεστ που έχει προταθεί για την ταχεία ανίχνευση παραγωγής ESBLs είναι το ESBL-NDP test με αποτελέσματα εντός 15-30 λεπτών. Αναφέρεται σε μελέτες ότι έχει ευαισθησία 92,6% - 98% και ειδικότητα 100%. Βασίζεται στην *in vitro* αναγνώριση της υδρόλυσης της κεφοταξίμης και της αναστολής της με την προσθήκη ταζοβακτάμης. Χρησιμοποιείται ένας δείκτης pH , το ερυθρό της φαινόλης, που αλλάζει χρώμα με τη μείωση του pH. Το τεστ είναι θετικό και άρα παράγεται ESBL, όταν μετά την προσθήκη του εξεταζόμενου στελέχους, το μεν διάλυμα κεφοταξίμης- δείκτη αλλάζει χρώμα από κόκκινο σε κίτρινο (λόγω της μείωσης του pH κατά την υδρόλυση της κεφοταξίμης) , το δε διάλυμα κεφοταξίμης- δείκτη- ταζοβακτάμης παραμένει με κόκκινο χρώμα. Όταν αλλάξει το χρώμα και του διαλύματος που περιέχει τον αναστολέα, τότε το τεστ θεωρείται αρνητικό ως προς την παραγωγή ESBL, αλλά υπονοεί την ύπαρξη καρβαπενεμασών ή AmpCs. Η δοκιμασία αυτή εφαρμόζεται τόσο σε στελέχη που καλλιεργήθηκαν στα συνήθη θρεπτικά υλικά όσο και απευθείας σε δείγματα ούρων και σε θετικές

αιμοκαλλιέργειες χωρίς να μειώνεται η ευαισθησία και η ειδικότητα. Είναι αξιόπιστο στην ανίχνευση των CTX-Ms (ευαισθησία και ειδικότητα 100%). Το ESBL-NDP τεστ μπορεί να φανεί χρήσιμο για τον ταχύ εντοπισμό φορέας ασθενών, νωρίς στη νοσηλεία τους και την έγκαιρη αναγνώριση επιδημίας από ESBL-παραγωγά στελέχη. Μπορεί επίσης να καθοδηγήσει στην αρχική επιλογή αντιβιοτικού, όταν βγει θετικό ,ειδικά σε χώρες με χαμηλό επιπολασμό καρβαπενεμασών, ενώ όταν είναι αρνητικό και συνέβη αλλαγή στο διάλυμα του αναστολέα , κατευθύνει σε περαιτέρω διερεύνηση. Μπορεί να συνδυαστεί με το ταχύ διαγνωστικό τεστ για τις καρβαπενέμες ,το Carba-NP, και να συμβάλλουν έτσι καθοριστικά στην πρόωμη έναρξη της κατάλληλης αγωγής [387,399,400].Ένα δεύτερο ταχύ διαγνωστικό τεστ είναι το β-Lacta test που δίνει αποτελέσματα εντός 2-15 λεπτών. Περιέχει μια χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη, την HMRZ-86. Το αρχικό της χρώμα είναι κίτρινο που μεταβάλλεται σε κόκκινο όταν υδρολυθεί . Η HMRZ-86 υδρολύεται ισχυρά από τις ESBLs. Επίσης, υδρολύεται από τις καρβαπενεμάσες και τις AmpC-β- λακταμάσες. Επομένως, το β-Lacta test δεν μπορεί να διακρίνει αν το θετικό αποτέλεσμα οφείλεται σε παραγωγή ESBLs ή στην παραγωγή των άλλων β-λακταμασών. Η ευαισθησία της δοκιμασίας ,σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες, κυμαίνεται από 84,8% ως 95,7% και η ειδικότητα της από 71% ως 100%. Πραγματοποιείται με αποικίες μικροβίου σε MH άγαρ ,αν και έχει δοκιμαστεί σε θετικές αιμοκαλλιέργειες και απευθείας σε δείγματα ούρων. Επομένως, το τεστ αυτό αν και έχει υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση των ESBLs , η θετική προγνωστική του αξία είναι χαμηλή γιατί επίσης ανιχνεύει τις AmpCs και τις σερινοκαρβαπενεμάσες. Είχαν, επίσης, προταθεί χάρτινες ταινίες με διάφορες χρωμογόνες ουσίες για την ταχεία ανίχνευση και διάκριση μεταξύ των ESBLs , AmpCs και MBLs, αλλά το τεστ αυτό , το cica-β strip test, είναι μέτριας ευαισθησίας και ειδικότητας (εικόνα 50) [401,405].

Άλλη μία ταχεία βιοχημική μέθοδος είναι η τροποποίηση του τεστ νιτροσεφίνης, το Pentawell test .Η Nitrocefin είναι μία χρωμογόνος κεφαλοσπορίνη που αλλάζει χρώμα από κίτρινο σε κόκκινο, όταν υδρολύεται από β-λακταμάσες.Δεν μπορεί να διακρίνει τον τύπο των β-λακταμασών. Το Pentawell test είναι το τροποποιημένο

τεστ και αφορά στην προσθήκη αναστολέων β-λακταμασών, όμως η ανίχνευση των ESBLs δεν γίνεται με μεγάλη ειδικότητα [428].

Ένα άλλο τεστ ταχείας ανίχνευσης της παραγωγής των ESBLs προτάθηκε το 2013 από τους Faria-Ramos et al και βασίζεται στις αρχές της κυτταρομετρίας ροής. Τα εξεταζόμενα στελέχη επωάζονται με κεφταζιδίμη ή κεφοταξίμη, χωρίς ή με κλαβουλανικό οξύ, για 1-2 ώρες και στη συνέχεια χρωματίζονται με φθορίζουσα ουσία που διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη. Τα στελέχη που δεν παράγουν ESBLs δίνουν υψηλό σήμα κατά την ανίχνευση του φθορισμού. Τα στελέχη που είναι παραγωγείς ESBLs δίνουν υψηλό σήμα μόνο αν έχουν επωαστεί με κλαβουλανικό. Σε διάφορες μελέτες η ευαισθησία είναι 91% και η ειδικότητα 77,8% [413,414].



εικόνα 50: α) το βιοχημικό τεστ για την ταχεία αναγνώριση της παραγωγής ESBLs, το ESBL-NDP test, το οποίο βασίζεται στην ανίχνευση της αλλαγής του pH με το ερυθρό της φαινόλης. Τα στελέχη 1 και 2 είναι αντίστοιχα αρνητικό και θετικό control. Τα στελέχη 3 και 5 είναι παραγωγείς ESBLs και το στέλεχος 4 δεν παράγει ESBLs. Αν και το τρίτο διάλυμα (με τον αναστολέα) είναι κίτρινο, αυτό υποδεικνύει άλλο μηχανισμό αντοχής στις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος πχ AmpCs ή καρβαπενεμάσες β) το ή β-Lacta test. Η δοκιμασία είναι θετική όταν η χρωμογόνο κεφαλοσπορίνη HMRZ-86 αλλάζει χρώμα από κίτρινο σε κόκκινο. Η θετικοποίηση του τεστ δεν σημαίνει αποκλειστικά την παρουσία ESBLs, αλλά μπορεί να υποδεικνύει την παραγωγή καρβαπενεμασών ή AmpCs γ) το cica-β-strip test. Οι ταινίες είναι εμποτισμένες με χρωμογόνες ουσίες για τη διάκριση των ESBLs, MBLs και AmpCs. Για την ανίχνευση ESBLs χρησιμοποιείται η HMRZ-86.

7.4 μοριακές τεχνικές ανίχνευσης ESBLs

Η μοριακή βιολογία έχει μια πληθώρα εφαρμογών υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας στην κλινική μικροβιολογία, και ειδικότερα όσον αφορά στη μικροβιακή αντοχή, παρέχει τεχνικές για την τυποποίηση και ταυτοποίηση, την επιδημιολογία και τον προσδιορισμό μηχανισμών αντοχής (γονίδια , μεταλλάξεις) με το βασικό πλεονέκτημα της ταχύτατης λήψης των αποτελεσμάτων. Οι περισσότερες μοριακές μέθοδοι βασίζονται στην ανίχνευση και στο μερικό ή πλήρη χαρακτηρισμό του μικροβιακού γενετικού υλικού στο κλινικό δείγμα. Συνήθως για να έχουν τη μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα προϋποθέτουν την καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου και την εξαγωγή του DNA, όμως στις μέρες μας η τεχνολογία προσανατολίζεται στην ανάπτυξη μεθόδων ακριβείας που να αποδεδειγμένα από την καλλιέργεια και να μπορούν να εφαρμοστούν άμεσα σε κλινικά δείγματα ή ολικό αίμα, ακόμη και παρά τη κλίνη του ασθενούς. Ειδικότερα, η ανίχνευση των ESBLs μπορεί να γίνει με:

α) PCR τεχνικές (μονού τελικού σημείου και multiplex PCR, nested PCR, RT-PCR). Είναι από τις πιο διαδεδομένες μοριακές τεχνικές , χρυσό πρότυπο (gold standard) στη διάγνωση λοιμώξεων και στον εντοπισμό της μικροβιακής αντοχής. Η μέθοδος PCR επιτρέπει την παραγωγή πολύ μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός (αν πρόκειται για single-end PCR) ή περισσότερων (αν πρόκειται για multiplex PCR) συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων (gene target). Με τη PCR , δηλαδή, ανιχνεύονται μόνο τα γονίδια αντοχής που στοχεύουμε. Εξέλιξη της τεχνικής αποτελεί η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ,μονή ή multiplex, η οποία είναι ποιοτική και ποσοτική μέθοδος, ταχύτατη (περίπου 2 ώρες), δεν απαιτεί ηλεκτροφορητική ανάλυση και πολλές φορές ούτε και νουκλεοτιδική αλληλούχιση του τελικού προϊόντος. Το προϊόν συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική. Η real-time PCR επιτελεί τον πολλαπλασιασμό του στόχου και την ανίχνευση στο ίδιο σωληνάριο καταγράφοντας συνεχώς την κινητική της αντίδρασης .

Στις μέρες μας ,αναπτύσσονται και δοκιμάζονται multiplex PCR τεχνικές που αναγνωρίζουν με ακρίβεια και ταχέως (σε 1-6 ώρες) πολλαπλά παθογόνα και γονίδια αντοχής ταυτοχρόνως, πολλές φορές απευθείας σε θετικές αιμοκαλλιέργειες, αλλά έχουν δοκιμαστεί άμεσα και σε κλινικά δείγματα (πχ ούρα,

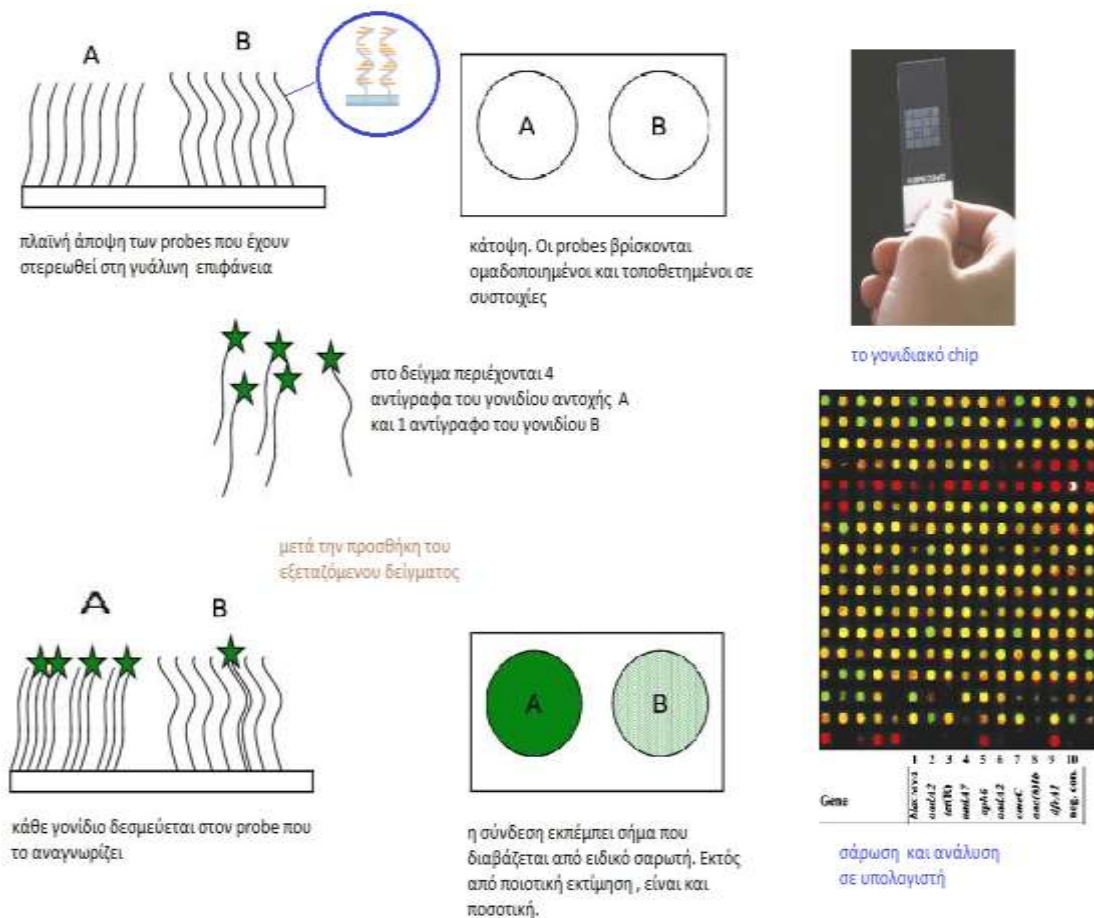
πτύελα, ορθικό επίχρισμα, πύον, κόπρανα) ή στο ολικό αίμα . Πρόκειται για πλήρως αυτοματοποιημένα συστήματα, που δεν απαιτούν μεγάλη εμπειρία και επιδεξιότητα, και συνδυάζουν την εκχύλιση του DNA, την ενίσχυση του και την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευσή σε ένα βήμα. Τέτοιο διαθέσιμο εργαλείο είναι η πλατφόρμα Cepheid GeneXpert . Άλλα αυτοματοποιημένα συστήματα multiplex PCR , 2 βημάτων όμως , που επιτρέπουν τη διαφοροδιάγνωση σε επίπεδο είδους και σε επίπεδο γονιδίου αντοχής είναι πχ τα LightCycler SeptiFast, Plex-ID, SepsiTst, VYOO, Identibac AMR, Uryvero-System κα. Επίσης, τα ενιαία αυτά συστήματα είναι δυνατόν να συνδυάζουν τις διάφορες PCR τεχνικές με άλλες μεθόδους της μοριακής βιολογίας όπως ELISA (πχ Hyplex Superbug ID) , κυτταρομετρία ροής με σημασμένα μικροσφαιρίδια (πχ Luminex), τεχνική μικροσυστοιχιών (πχ Verigene, Vap Chip) και Electrospray Ionization Mass Spectrometry (πχ IRIDICA, Plex-ID BAC) .

Στην ανίχνευση των ESBLs ειδικά, υπάρχουν διαθέσιμα συστήματα υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας , όπως είναι για παράδειγμα τα Check Direct assays (Checks points), Hyplex ESBL ID Multiplex PCR, Luminex xTAG και VAP Chip. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι ευαισθησία αυτών των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων υπερβαίνει το 98% και η ειδικότητα τους είναι 92-98%.

Εναλλακτική των PCR, ταχεία και πολύ πιο οικονομική μέθοδος πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων για τον εντοπισμό γονιδίων ESBLs είναι η ισοθερμική μέθοδος LAMP , κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός του DNA γίνεται σε μία και σταθερή θερμοκρασία και το τελικό προϊόν μπορεί να παρατηρηθεί και οπτικά με την αλλαγή χρώματος μέσα στο σωληνάριο από πορτοκαλί σε κιτρινοπράσινο ή με την ανίχνευση του φθορισμού , καθώς πρόκειται για τη φθορίζουσα ουσία SYBR Green.Εμπορικά διαθέσιμη είναι για παράδειγμα η Eazyplex [406-409,419].

β) τεχνολογία μικροσυστοιχιών DNA (DNA microarray), γνωστό και ως «γονιδιακό chip». Η DNA microarray είναι σύγχρονη τεχνική της μοριακής βιολογίας που επιτυγχάνει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτική εκτίμηση πολλών (ακόμη και χιλιάδων) γονιδίων σε μία και μόνο αντίδραση. Προκαθορισμένα ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα DNA-ανιχνευτές (probes) τακτοποιούνται σε συγκεκριμένες θέσεις και σειρές πάνω σε μια στερεή επιφάνεια, συνήθως από γυαλί ή σιλικόνη. Κάθε

ανιχνευτής μπορεί να αναγνωρίσει και να συγκρατήσει μέσω υβριδισμού το γονίδιο αντοχής, στο οποίο είχε σχεδιαστεί να στοχεύσει. Κάθε επιτυχής σύνδεση ανιχνευτή και γονιδίου-στόχου παρέχει ένα σήμα, που διαβάζεται από ειδικό σαρωτή και η εικόνα αναλύεται μέσω υπολογιστή. Όσοι περισσότεροι probes «δέσουν» γονίδια, τόσο δυνατότερο το σήμα. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας και σε θετικές αιμοκαλλιέργειες. Συνήθως συνδυάζεται με τεχνικές PCR. Ο χρόνος για τα αποτελέσματα είναι 2-6 ώρες. Η DNA microarray έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει την παρουσία των γονιδίων αντοχής σε ένα δείγμα, αλλά και τους ποικίλους πολυμορφισμούς σε συγκεκριμένες θέσεις. Μπορεί στον ίδιο χρόνο να εξετάζει πολλά δείγματα (μέχρι 40). Η τεχνική αυτή εμφανίζει εξαιρετική ικανότητα στον εντοπισμό των γονιδίων ESBLs (ευαισθησία και ειδικότητα 100%). Εμπορικά διαθέσιμες τεχνολογίες μικροσυστοιχιών είναι πχ οι πλατφόρμες Check-points, που εντοπίζουν ESBLs με 100% ευαισθησία και ειδικότητα (εικόνα 51) [409-412].



εικόνα 51: αρχές λειτουργίας της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA

γ) φασμαφωτομετρία μάζας MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of Light Mass Spectrometry). Η τεχνολογία MALDI-TOF MS στηρίζεται στη δημιουργία φάσματος πρωτεϊνών και πεπτιδίων αυξανόμενης μάζας, το οποίο οδηγεί σε ένα χαρακτηριστικό συνδυασμό κορυφών, το πρωτεϊνικό προφίλ, ξεχωριστό για κάθε κλώνο παθογόνου και μπορεί, για παράδειγμα, να διακρίνει τον κλώνο *E.coli* ST 131, που συνδέεται στενά με την έκφραση ESBLs και ειδικά της CTXM-15, από άλλα στελέχη.

Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατεύθυνση της ανίχνευσης μηχανισμών βακτηριακής αντοχής με αποτελέσματα να προκύπτουν σε 30min- 4 ώρες, αναλόγως του πρωτοκόλλου. Στην κλινική μικροβιολογία προσφάτως εισήχθη η Mass Spectrometric Beta- Lactamase -assay (MSBL) που αναγνωρίζει την ενζυματική υδρόλυση των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Εντοπίζει την παραγωγή β-λακταμασών, συμπεριλαμβανομένων των ESBLs, με έμμεσο τρόπο ανιχνεύοντας το αντιβιοτικό και τα προϊόντα υδρόλυσης του παρουσία ενζύμου και αυτό αποτυπώνεται σε χαρακτηριστικό πρότυπο κορυφών. Η κεφαλοσπορίνη ευρέος φάσματος επώαζεται μαζί με το υπό εξέταση βακτήριο σε ρυθμιστικό διάλυμα για 1-3 ώρες και στη συνέχεια εξετάζεται φασματοφωτομετρικά αν υπάρχουν προϊόντα αποδόμησης του αντιβιοτικού συνεπεία παραγωγής ESBLs απουσία ή παρουσία β-λακταμικού αναστολέα.

Άλλη μια εφαρμογή της τεχνολογίας MALDI-TOF MS, εφόσον έχει προηγηθεί PCR, είναι η μικρο-αλληλούχιση, με την οποία είναι δυνατόν να εντοπιστούν πολυμορφισμοί στα γονίδια αντοχής πχ στα γονίδια bla_{TEM} και έτσι σε μία και μόνο αντίδραση μπορούν να ανιχνευτούν όλοι οι διαφορετικοί τύποι των TEM-ESBLs.

Μια πολλά υποσχόμενη συνδυαστική τεχνολογία της φασματομετρίας μάζας και τεχνικών PCR, για την αλληλούχιση γονιδίων αντοχής και τον εντοπισμό πολυμορφισμών, είναι και η PCR/ Electrospray Ionization Spectrometry (PCR/ESI-MS), που μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα ευρεία ποικιλία γονιδίων αντοχής, ακόμη και στις περιπτώσεις εκείνες που είναι μικρό το μέγεθος (100-400bp) ή το γενετικό φορτίο.

Η SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) αποτελεί και αυτή εφαρμογή της MALDI-TOF MS στην αναζήτηση της αντοχής. Βασίζεται στην αρχή ότι οι πρωτεΐνες συντίθενται από αμινοξέα. Προσθέτοντας στα καλλιεργητικά μέσα σημασμένα και μη, αμινοξέα και το αντιβιοτικό-δείκτη, κατόπιν κατάλληλης επεξεργασίας, διαμορφώνεται ένα χαρακτηριστικό σχέδιο κορυφών με το οποίο τελικά συγκρίνεται το αντίστοιχο προφίλ του υπό εξέταση μικρόβιου. Τα αποτελέσματα προκύπτουν εντός 2-4 ωρών και είναι συγκρίσιμα με τη κλασική μέθοδο προσδιορισμού MIC.

Η μεθοδολογία MALDI-TOF συνήθως προϋποθέτει καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου (έχει εφαρμοστεί και σε υποκαλλιέργειες 2 - 6 ωρών), αλλά έχει δοκιμαστεί και απευθείας σε υλικό από θετικές αιμοκαλλιέργειες ή ολικό αίμα. Μελέτες έχουν ως τώρα δείξει ότι οι διάφορες εφαρμογές της MALDI-TOF στον προσδιορισμό της αντοχής έχουν ευαισθησία 72,5-100% και ειδικότητα 95-100% αναλόγως του εξεταζόμενου υλικού και του βακτηριακού είδους . Εμπορικά διαθέσιμα συστήματα MALDI-TOF είναι τα : Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France), bioMérieux Vitek MS System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and the Andromas (Beckman Coulter, Villepinte, France) system, [415-418].

δ) αλληλούχιση νέας γενιάς ή αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος (next generation sequencing NGS ή whole genome sequencing WGS αντιστοίχως). Χαρακτηρίζονται έτσι ταχείες αξιόπιστες τεχνικές με τις οποίες εντοπίζονται πιο εύκολα και πιο οικονομικά πολλά μικρά τμήματα DNA ή και ολόκληρο το γονιδίωμα του μικροβίου , συμπεριλαμβανομένου του μιτοχονδριακού DNA, ενώ μπορούν να αναγνωριστούν και μεταλλάξεις. Προβλέπεται ότι σε μερικά χρόνια θα αποτελούν εξέταση ρουτίνας και θα αλλάξουν το χώρο της κλινικής μικροβιολογίας . Συντελούν στην ανίχνευση των γονιδίων αντοχής και στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας, και φαίνεται ότι θα αποτελέσουν σημαντικά διαγνωστικά και επιδημιολογικά εργαλεία βελτιώνοντας τη θεραπευτική πρακτική και την εφαρμογή των μέτρων ελέγχου λοιμώξεων ,αλλά και συνεισφέροντας επίσης στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων [429,430]. Η εξαιρετικά σημαντική συμβολή τους στην ανίχνευση μηχανισμών αμύνης αποδείχτηκε κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας από εντεροαιμορραγικό *E. coli* στη Γερμανία το 2011, όπου άμεσα με την εφαρμογή των NGS εντοπίστηκε στο

βακτήριο αυτό το γονίδιο CTX-M-15. Παρέχουν, επίσης, τη δυνατότητα εντοπισμού ακόμη και μικρών υποπληθυσμών μεταλλαγμένων στελεχών, ενώ μπορούν να εντοπίσουν μεταλλαγμένες ή νέες β-λακταμάσες, όπως και άλλα γονίδια αντοχής. Οι NGS αποδεσμεύουν από την ανάγκη καλλιέργειας, αλλά απαιτούν εξοικείωση με την τεχνολογία της βιοπληροφορικής. Βασίζονται στην ανίχνευση και καταγραφή σε πραγματικό χρόνο είτε της εκπομπής φωτός (πυροαλληλούχιση) είτε του φθορισμού από σημασμένα νουκλεοτίδια (πχ Illumina MiSeq, SOLiD, SMRT) είτε της τοπικής αλλαγής pH (Ion Torrent).

Στην ανίχνευση των ESBLs μέχρι σήμερα έχουν αξιοποιηθεί: i) η πυροαλληλούχιση (πχ Roche 454), κατά την οποία γίνεται ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μέσω του πυροφωσφορικού και συνοδεύεται από εκπομπή φωτός, που είναι χαρακτηριστική για κάθε νουκλεοτιδική βάση. Με την πυροαλληλούχιση αναγνωρίζονται με ακρίβεια τα γονίδια των ESBLs στα εξεταζόμενα στελέχη. Με την ανάλυση πολυμορφισμών στα γονίδια bla_{TEM} και bla_{SHV} αναγνωρίζονται οι ποικίλες παραλλαγές των bla γονιδίων και μπορεί να ανακαλυφθούν και νέες [420-423] ii) Ion Torrent sequencing, κατά την οποία ο προσδιορισμός της αλληλουχίας γίνεται με την ανίχνευση των τοπικών αλλαγών pH λόγω της απελευθέρωσης ιόντων υδρογόνου κατά την προσθήκη της βάσης. Έχει εφαρμοστεί σε επιδημίες, όπου με ακρίβεια αναγνώρισε τα γονίδια ESBLs και ειδικά των CTX-Ms [424-426].

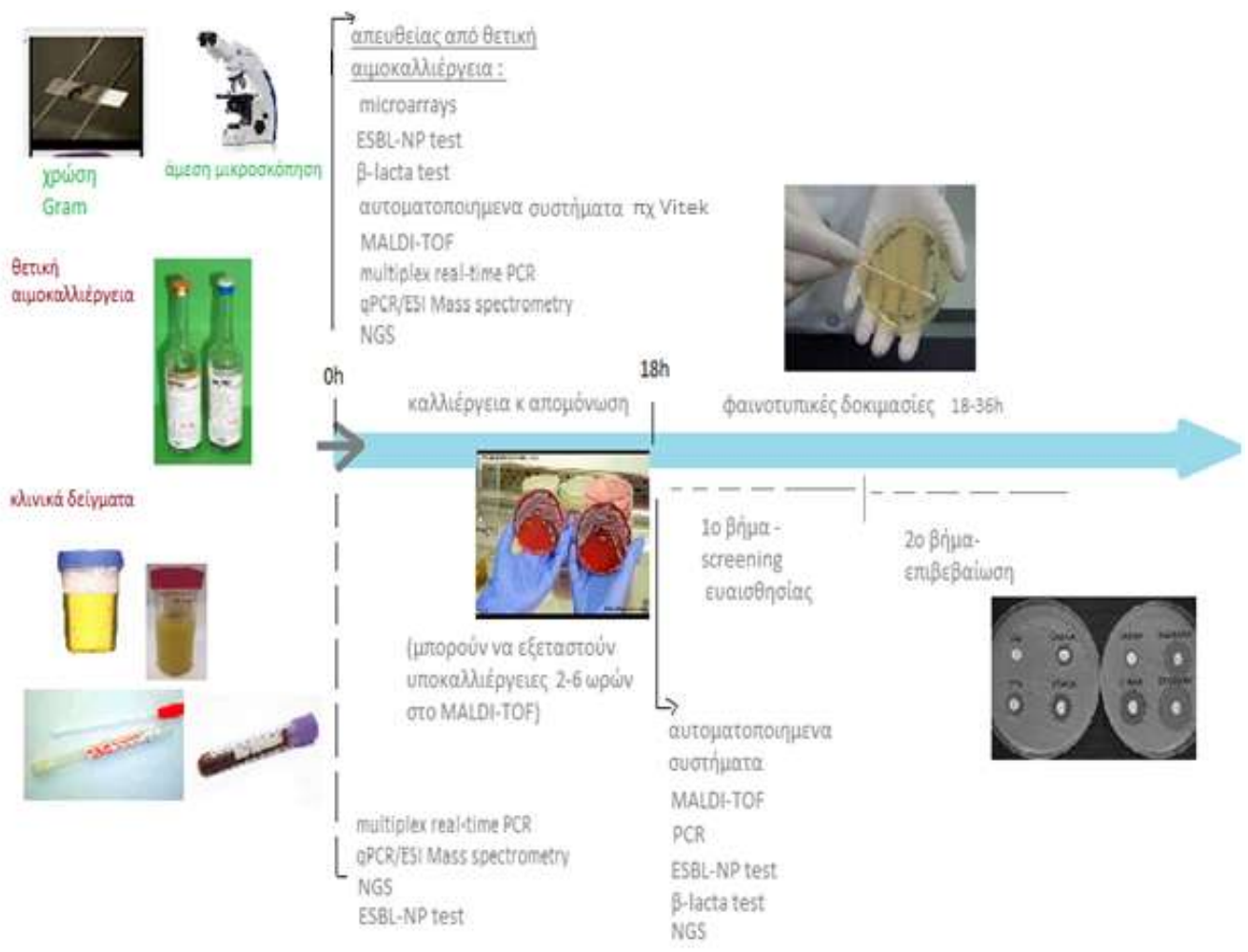
Οι μοριακές τεχνικές κατακτούν όλο και περισσότερο έδαφος στη σύγχρονη έρευνα και εκτός από τη μοριακή ανάλυση γονιδίων (γονιδιωματική, genomics) κατευθύνονται και προς την ανάλυση των πρωτεϊνών (πρωτεομική, proteomics). Οι πρωτεΐνες αποτελούν έκφραση της γενετικής πληροφορίας, οπότε με την πρωτεομική θα αποκτήσουμε πιο σαφή εικόνα των λειτουργικών γονιδίων. Έχουν φανεί μέχρι σήμερα πολύ χρήσιμες ως επιδημιολογικά εργαλεία, αλλά αναμένεται να κατακτήσουν σημαντική θέση στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο εξασφαλίζοντας την έγκαιρη διάγνωση με σκοπό την κατάλληλη διαχείριση των λοιμώξεων.

Στην εικόνα που ακολουθεί, αποτυπώνονται οι εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης της παραγωγής των ESBLs και τα χρονικά σημεία εφαρμογής τους:

i) Η χρώση Gram και η άμεση μικροσκόπηση είναι δυνατόν άμεσα να παρέχουν τις πρώτες πληροφορίες (για τον τύπο των βακτηρίων και αν πρόκειται για πολυβακτηριακή λοίμωξη).

ii) οι κλασικές τεχνικές, που βασίζονται στο αρχικό screening ευαισθησίας του απομονωθέντος στελέχους και στην εν συνεχεία φαινοτυπική επιβεβαίωση (απαιτούν το ελάχιστο περίπου 48 ώρες από τη λήψη κλινικού δείγματος) και

iii) οι σύγχρονες μοριακές τεχνικές, που πολλές φορές αποδεσμεύουν από την ανάγκη καλλιέργειας και απομόνωσης. Μπορούν για παράδειγμα να εφαρμοστούν άμεσα σε θετική αιμοκαλλιέργεια, και κάποιες απ' αυτές απευθείας σε ολικό αίμα.



8. Παρουσία των ESBLs σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη

8.1 Εισαγωγή

Για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων προκαλούμενων από βακτήρια που παράγουν ESBLs ή AmpC-κεφαλοσπορινάσες χρησιμοποιούνται οι καρβαπενέμες, καθώς εμφανίζονται ανθεκτικές απέναντι σε αυτούς τους μηχανισμούς αντοχής. Αν και η ακριβής επίπτωση των στελεχών με ESBLs είναι άγνωστη, εμφανίζεται προοδευτικά αυξανόμενη σε πολλά μέρη του κόσμου. Σε κάποιες περιοχές μάλιστα, ιδιαίτερα στη Νότια και Ν.Α. Ασία, η κατάσταση θεωρείται υπερενδημική, ενώ εκτιμάται ότι παγκοσμίως 10-40% των στελεχών *E.coli* και *K.pneumoniae* είναι ESBL-θετικά. Ενώ αρχικά τα κλινικά μικροβιακά στελέχη απομονώνονταν στο νοσοκομειακό περιβάλλον, τα τελευταία χρόνια γίνεται εκτενής αναφορά για την εμφάνιση λοιμώξεων κοινότητας, ακόμη και βακτηριαμιών, οφειλούμενες σε στελέχη που παράγουν ESBLs [229,230,231,238,501,502].

Το CLSI έχει αναθεωρήσει τα όρια για τις κεφαλοσπορίνες και οι MICs δίνονται στον κλινικό ως έχουν. Τώρα πια, με τα αναθεωρημένα όρια, στην περίπτωση παραγωγής ESBLs, τα στελέχη δεν δηλώνονται ανθεκτικά σε όλες τις κεφαλοσπορίνες όπως συνέβαινε στο παρελθόν, ενώ δεν είναι απαραίτητες οι φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης της παραγωγής ESBLs. Όμως, σημαντικός αριθμός στελεχών που παράγουν ESBLs εμφανίζονται ευαίσθητα στην κεφταζιδίμη με τα νέα όρια του CLSI.

Η επιλογή των καρβαπενεμών παραμένει θεραπεία πρώτης γραμμής. Ελλείψει καλά οργανωμένων τυχαιοποιημένων διπλών τυφλών κλινικών μελετών στην περίπτωση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη και σαφών κατευθυντήριων οδηγιών, οι καρβαπενέμες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στη σήψη από την πρώτη στιγμή ως εμπειρική θεραπεία και αυτό φαίνεται από τη συνεχώς αυξανόμενη κατανάλωσή τους παγκοσμίως, με συνέπεια και την αυξανόμενη αντοχή σε αυτές [496-500]. Η αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να οφείλεται:

1) σε συνδυασμό μηχανισμών αντοχής, όπως πχ παρουσία ESBLs/AmpCs και απώλεια ή διαταραχή πορίνης, παρουσία ESBLs/AmpCs και αύξημένη δραστηριότητα αντλιών εκροής [276,506,507]

2) σε παραγωγή των καρβαπενεμασών . Οι καρβαπενεμάσες ταξινομούνται σε 3 κύριες κατηγορίες: α) οι σερινο-καρβαπενεμάσες που ανήκουν στην τάξη A κατά Ambler. Σε αυτές ανήκουν οι οικογένειες KPC, GES/IBC, IMI/NMC-A και SME, η SFC-1, η BIC-1 , η SHV-38 και η FIR-1 . Κυρίαρχη θέση στην ομάδα αυτή κατέχουν οι KPC. β) οι MBL, που ανήκουν στην τάξη B κατά Ambler και περιλαμβάνουν τις NDM, VIM και IMP γ) οι OXA- καρβαπενεμάσες, που ανήκουν στην τάξη D κατά Ambler. Η OXA-48 είναι πιο διαδεδομένη στα εντεροβακτηριακά.

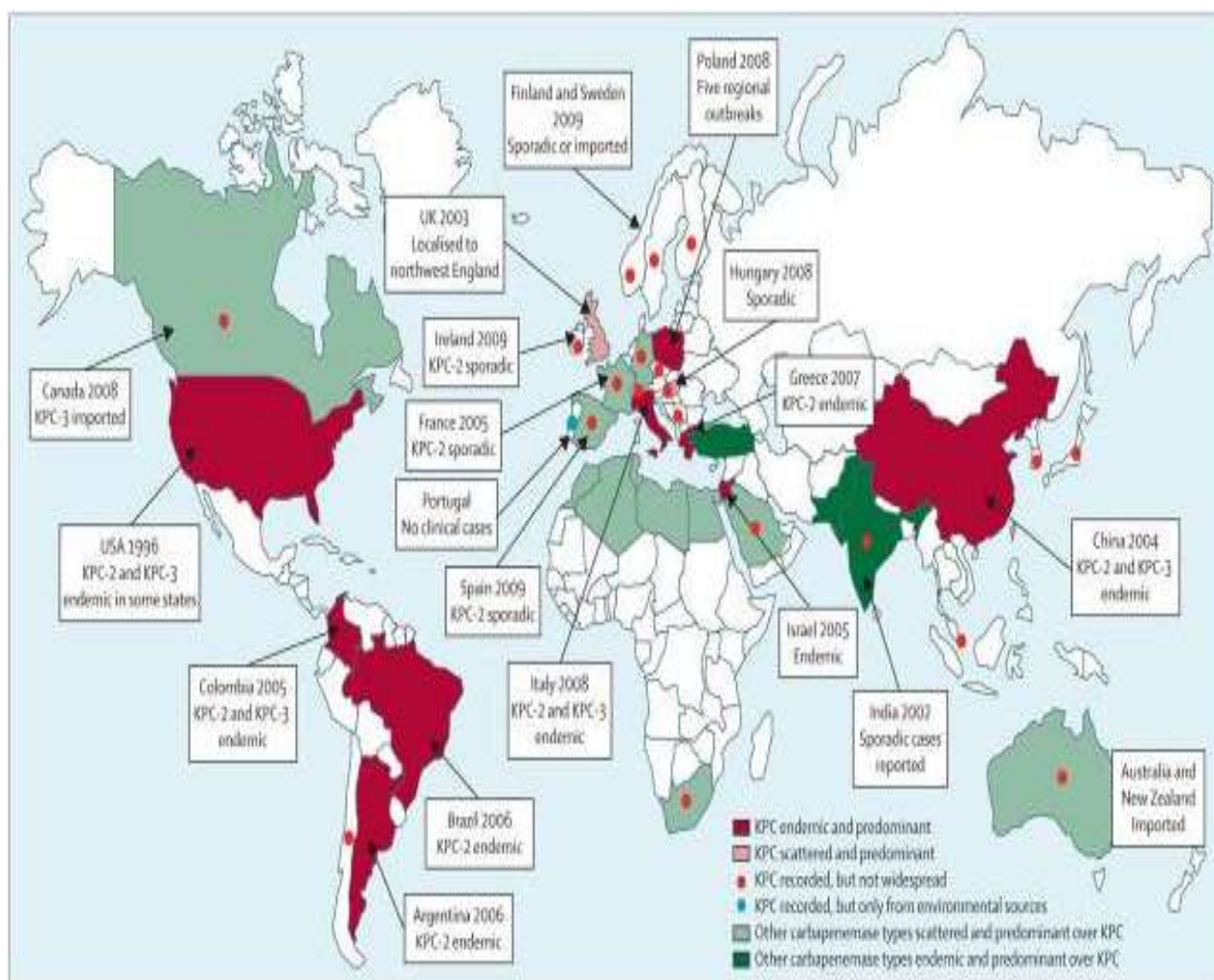
8.2 Καρβαπενεμάσες

8.2.1 KPC καρβαπενεμάσες

Οι KPC ανήκουν στη μοριακή τάξη A κατά Ambler και στην υποομάδα 2f κατά τη λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush. Είναι σερινοκαρβαπενεμάσες, δηλαδή έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο . Τα γονίδια KPC εντοπίζονται σε μεταφερόμενα πλασμίδια. Το πρώτο μέλος της οικογένειας KPC , η KPC-1, ανακαλύφθηκε το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα . Η KPC-1 ήταν ανθεκτική σε όλες τις β-λακτάμες, αλλά οι MICs στις καρβαπενέμες μειώνονταν παρουσία κλαβουλανικού οξέος [502,503].

Σύντομα η ανακάλυψη της KPC-1 ακολουθήθηκε από την εντόπιση της KPC-2 ,που διέφερε μόνο κατά ένα αμινοξύ, επίσης στην ανατολική ακτή των ΗΠΑ το 2003. Το ίδιο διάστημα, μία τρίτη σερινοκαρβαπενεμάση, η KPC-3 , έκανε την εμφάνιση της στο πλαίσιο επιδημίας από *K.pneumoniae* και *Enterobacter* spp στη Νέα Υόρκη. Μετά την ταχεία εξάπλωση των KPC καρβαπενεμασών στις ΗΠΑ , άρχισαν να προκύπτουν αναφορές για KPC από όλον τον κόσμο. Η πρώτη αναφορά KPC εκτός ΗΠΑ αφορά σε επιδημία από KPC-3 στο Ισραήλ [502]. Οι KPC έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί σε Γαλλία, στη Σκωτία, Λατινική αμερική και Ν.Α.Ασία . Στην Ελλάδα, η παραγωγή KPC-2 μολονότι αναγνωρίστηκε σχετικά πρόσφατα αποτελεί τον επικρατέστερο μηχανισμό αντοχής των στελεχών *K.pneumoniae* [249,502]. Στην Ελλάδα θεωρείται ότι υπάρχει κατάσταση ενδημίας όσον αφορά στην παραγωγή KPC από τα εντεροβακτηριακά. Μάλιστα, έχει θεωρηθεί υπεύθυνη για τη μετάδοση στελεχών KPC- *K.pneumoniae* σε τουλάχιστον εννέα ευρωπαϊκές χώρες από το 2007 ως το 2010 με τεκμηριωμένη περαιτέρω μετάδοση σε τέσσερις από αυτές [279,502].

Ανησυχητική εξέλιξη στην εξάπλωση των KPC καρβαπενεμασών αποτελεί ο εντοπισμός KPC-2 σε πλασμίδιο στη *P.aeruginosa*. Η πρώτη αναφορά αφορούσε σε στέλεχος που απομονώθηκε στην Κολομβία το 2006 [482]. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν KPC-2 στο Πουέρτο Ρίκο, στο Τρινιντάντ και Τομπάγκο, στη Βραζιλία, στις ΗΠΑ και στην Κίνα, ενώ όλο και περισσότερο απομονώνονται στην Νότια Αμερική και στην περιοχή της Καραϊβικής [483-485]. Στην Ελλάδα, παραγωγή KPC σε *P.aeruginosa* ανακαλύφθηκε το 2013, επρόκειτο για στέλεχος που απομονώθηκε από μεταμοσχευμένο ασθενή [489,490]. Οι KPC- καρβαπενεμάσες προκαλούν έντονη ανησυχία, καθώς απομονώνονται με μεγάλη συχνότητα και έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Κατά την πενταετία 2005-2010, τα μέλη της οικογενείας των KPC αυξήθηκαν κατά 270% [312].



Γεωγραφική κατανομή των KPC-καρβαπενεμασών. Εικόνα από: *Lancet Infect Dis.* 2013 ; 13(9)

8.2.2 Μεταλλο-β-λακταμάσες

Οι μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) ανήκουν στη μοριακή τάξη Β κατά Ambler και στην ομάδα 3 κατά τη λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush [64,284, 292,296-300,312]. Πρόκειται για ένζυμα που χρειάζονται ένα ή δύο δισθενή μεταλλικά ιόντα, συνήθως Zn^{+2} , στο ενεργό τους κέντρο για να είναι δραστικά. Υδρολύουν αποτελεσματικά τις περισσότερες β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών. Δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη. Αναστέλλονται από μεταλλικούς χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA, ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη και την ταζοβακτάμη. Υποδιαιρούνται περαιτέρω στις υποκατηγορίες Β1, Β2 και Β3 ανάλογα με την ομολογία της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας τους και τη δομή του ενεργού τους κέντρου. Τα ένζυμα των υποτάξεων Β1 και Β3 χρειάζονται 2 ιόντα Zn^{+2} , ενώ τα ένζυμα της υποτάξης Β2 απαιτεί μόνο ένα ιόν Zn^{+2} , ενώ η σύνδεση και δεύτερου ιόντος προκαλεί αναστολή. Η ύπαρξη των MBL είχε γίνει γνωστή από τη δεκαετία του 1960 με τη μορφή των ενδογενών χρωμοσωμιακών MBLs σε ευκαιριακά παθογόνα, όπως οι L1, CphA, BcII και Sfh-1, αλλά ανησυχητική είναι η ανάδυση και αυξανόμενη διασπορά των επίκτητων MBL όπως είναι οι VIM, IMP και NDM, ενώ τα τελευταία χρόνια εντοπίστηκαν και οι SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM, KHM-1, DIM-1, που ακόμη απομονώνονται σπάνια και δεν έχουν διασπαρεί εκτός των ορίων των χωρών όπου εντοπίστηκαν. Τα ένζυμα αυτών των επίκτητων μέταλλο-β-λακταμασών φέρονται συνήθως σε ιντεγκρόνια 1^{ης} και 3^{ης} τάξης και εντοπίζονται σε πλασμιδια και στο χρωμόσωμα των βακτηρίων [64,284,296-300].

Η πρώτη επίκτητη μεταλλο-β-λακταμάση ανακαλύφθηκε σε στέλεχος *P.aeruginosa* στην Ιαπωνία το 1988. Ονομάστηκε IMP-1 λόγω της αντοχής στην ιμιπενέμη [468]. Έκτοτε οι IMPs έχουν αποκτήσει παγκόσμια διασπορά τόσο μεταξύ των εντεροβακτηριακών όσο και μεταξύ των αζυμωτικών βακτηρίων, και κυρίως στη *P.aeruginosa*. Η οικογένεια των IMPs έχει περισσότερα από 20 μέλη. Την πενταετία 2005-2010 εμφάνισε σχετικά μικρή αύξηση των μελών της, κατά 25% [312].

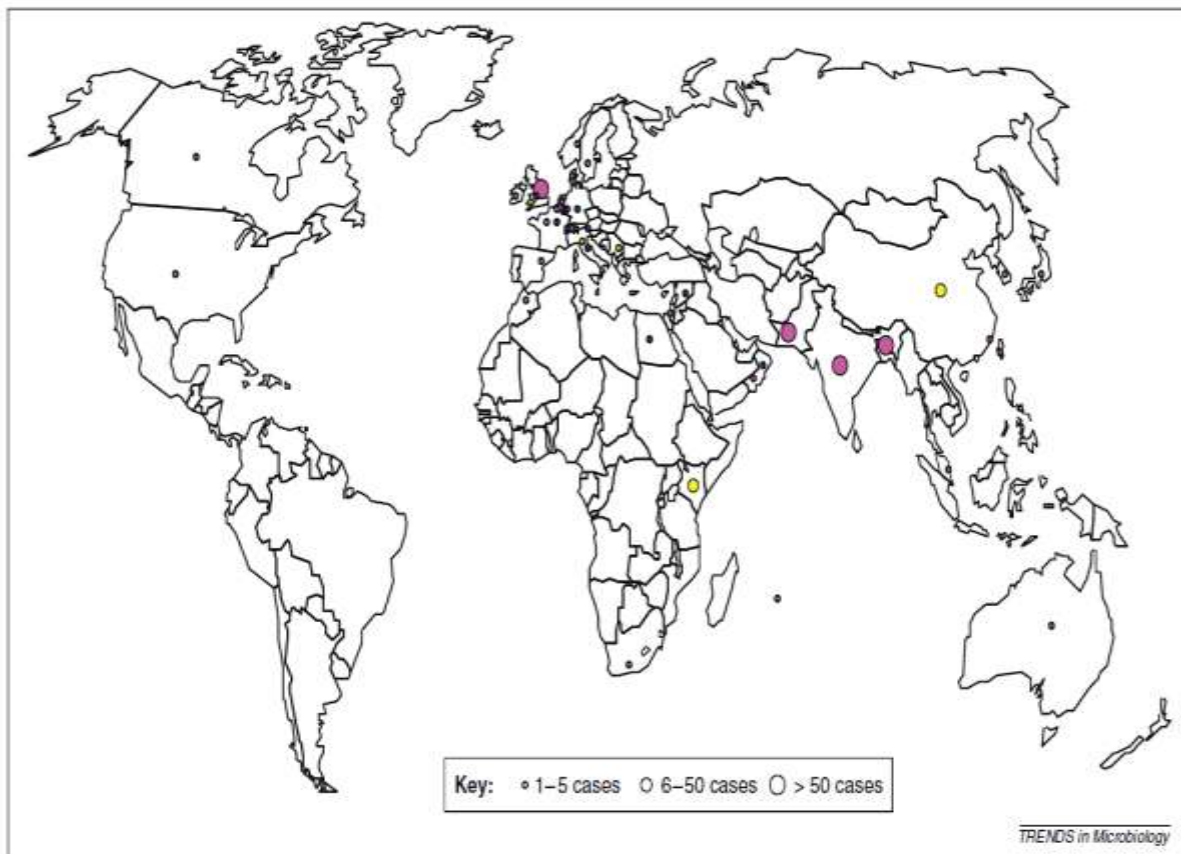
Η δεύτερη μεγάλη οικογένεια μεταλλο-β-λακταμασών είναι οι VIM. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν μικρή ομοιότητα με τις IMPs. Το πρώτο μέλος της οικογένειας, η VIM-1, απομονώθηκε στην Ιταλία το 1997 για πρώτη φορά στέλεχος *P.aeruginosa*

(Verona IMiprenemase-1) [469]. Η ομάδα των VIM περιλαμβάνει περισσότερα από 20 μέλη. Η διαδοσή τους είναι παγκόσμια. Κατά την πενταετία 2005-2010, η οικογένεια των VIM εμφάνισε πολύ μεγάλη αύξηση των μελών της , κατά 125% [312]. Ενώ αρχικά είχαν εντοπιστεί στα μη αζυμωτικά βακτήρια, τα γονίδια της πλέον εκφράζονται και στα εντεροβακτηριακά αποτελώντας σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Πρώτη αναφορά VIM σε εντεροβακτηριακά αφορά σε απομόνωση στελεχών *K.pneumoniae* και *E.clocae* , που παρήγαγαν VIM-4 , από ασθενή στην Ιταλία. Για πρώτη φορά στις ΗΠΑ, το 2010, αναφέρθηκε η απομόνωση στελέχους *K.pneumoniae* , που παρήγαγε VIM-1 , από ασθενή που είχε νοσηλευθεί προηγουμένως σε ελληνικό νοσοκομείο. Η εξάπλωση της VIM-1 σε στελέχη εντεροβακτηριακών στην Ελλάδα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 2001 σε στέλεχος *E.coli* [504].

Άλλές επίκτητες μεταλλο-β-λακταμάσες είναι η SPM-1 (1999,Βραζιλία), η GIM-1 (2002,Γερμανία), η AIM-1 (2006,Αυστραλία), η FIM-1 (2007,Ιταλία) η HBM-1 (2012,Γερμανία). Οι τελευταίες αυτές MBL δεν έχουν ξεπεράσει τα όρια της χώρας όπου εντοπίστηκαν σε αντίθεση με τις IMP και κυρίως τις VIM που έχουν διασπαρεί παγκοσμίως [470-474,478].

Από τις πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσες MBLs , σημαντικότερες είναι οι NDM (New Delhi MBLs). Η πρώτη είναι η NDM-1 , που απομονώθηκε αρχικά στη Σουηδία , το 2008, σε στέλεχη *K.pneumoniae* και *E.coli* από ασθενή που είχε νοσηλευθεί προηγουμένως στην Ινδία [63,64,476,505]. Έκτοτε έχει παρατηρηθεί παγκόσμια διασπορά.Στις περισσότερες περιπτώσεις , υπάρχει κάποια επιδημιολογική συσχέτιση με την Ινδική υποήπειρο (ασθενείς που είχαν προηγουμένως νοσηλευτεί σε ιδρύματα της Ινδίας ή που είχαν πρόσφατο ταξίδι στην περιοχή) . Δεύτερη δεξαμενή θεωρούνται οι περιοχές των Βαλκανίων και της Μέσης Ανατολής [476]. Η NDM-1 έχει ως επί το πλείστον εξαπλωθεί στα εντεροβακτηριακά και κυρίως σε *K.pneumoniae* και *E.coli*. Έχει επίσης απομονωθεί από στέλεχη *C.freundii*, *M.morganii*, *Providencia* spp, *E.clocae* , *P.mirabilis* σε Ινδία, Αγγλία , ΗΠΑ, Καναδά, Αφρική, Ιαπωνία, Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Κίνα [476, 505].

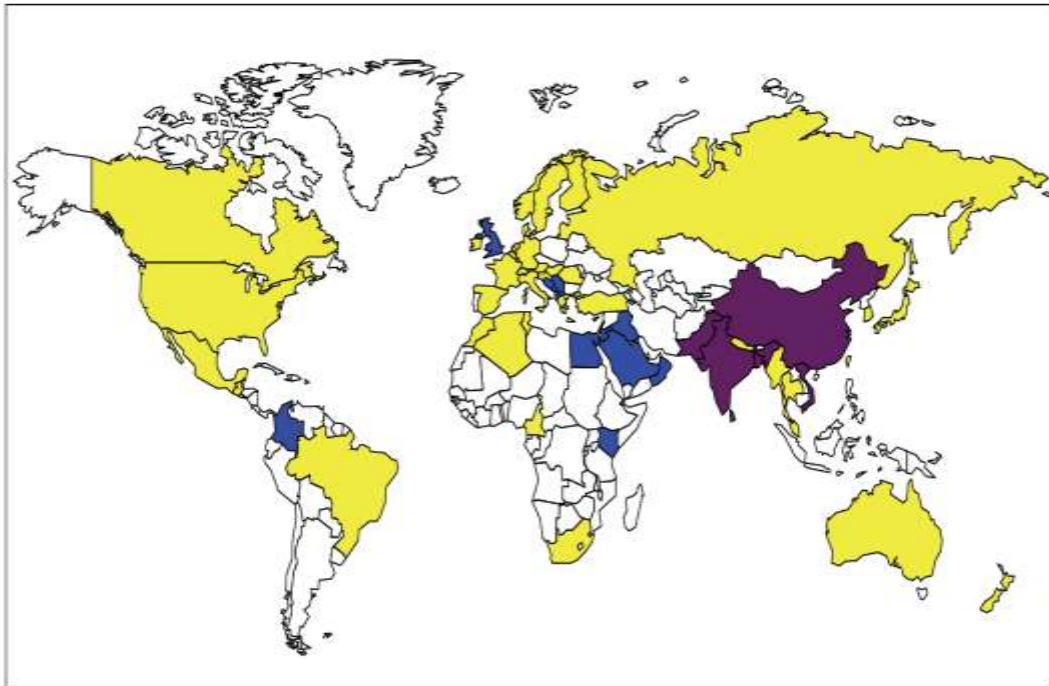
Η NDM-1 έχει εντοπιστεί σε *E.coli* ST131, γεγονός που εγείρει μεγάλη ανησυχία , καθώς ο συγκεκριμένος κλώνος είναι επιτυχημένος και έχει συντελέσει στην παγκόσμια διασπορά της CTXM-15 [343-349,476,505].



Γεωγραφική κατανομή NDM-1 στελεχών , πού έχουν απομονωθεί μέχρι τον Οκτωβριο του 2011. Το μέγεθος του κύκλου εκφράζει τον αριθμό των στελεχών , ενώ το χρώμα δείχνει επιδημιολογική συσχέτιση με χώρα προέλευσης: όταν αφορά την Ινδία (μωβ), τα Βαλκάνια και τη Μέση Ανατολή (μπλε) , άγνωστο (κίτρινο) . Αντιγραφή από [505]

Παραγωγή NDM-1 έχει παρατηρηθεί και σε στελέχη αζυμωτικών βακτηρίων, κυρίως *A.baumannii*. Η πλειονότητα των *A.baumannii* που παράγουν NDM έχουν απομονωθεί σε Κίνα και Μέση Ανατολή [476] . Η παραγωγή NDM-1 σε στελέχη ψευδομονάδας έχει αναφερθεί πιο σπάνια. Πρώτη αναφορά σε στέλεχος *P.aeruginosa* που παράγει NDM-1 είναι από τη Σερβία το 2011 [475]. Μάλιστα αναγνωρίζεται ότι το γονίδιο *bla_{NDM-1}* στις ψευδομονάδες είναι ενδημικό στα βαλκάνια [476,477], ενώ στελέχη *P.aeruginosa* που παράγουν NDM έχουν έκτοτε απομονωθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες καθώς και στην Ινδία και την Αίγυπτο [476-479].

Από το 2008 , οπότε και έγινε η ανακάλυψη της πρώτης NDM, έχουν ανακοινωθεί άλλα 15 μέλη.



- High prevalence of NDM producers (endemicity)
- Outbreaks and interregional spread of NDM producers
- Sporadic description of NDM producers

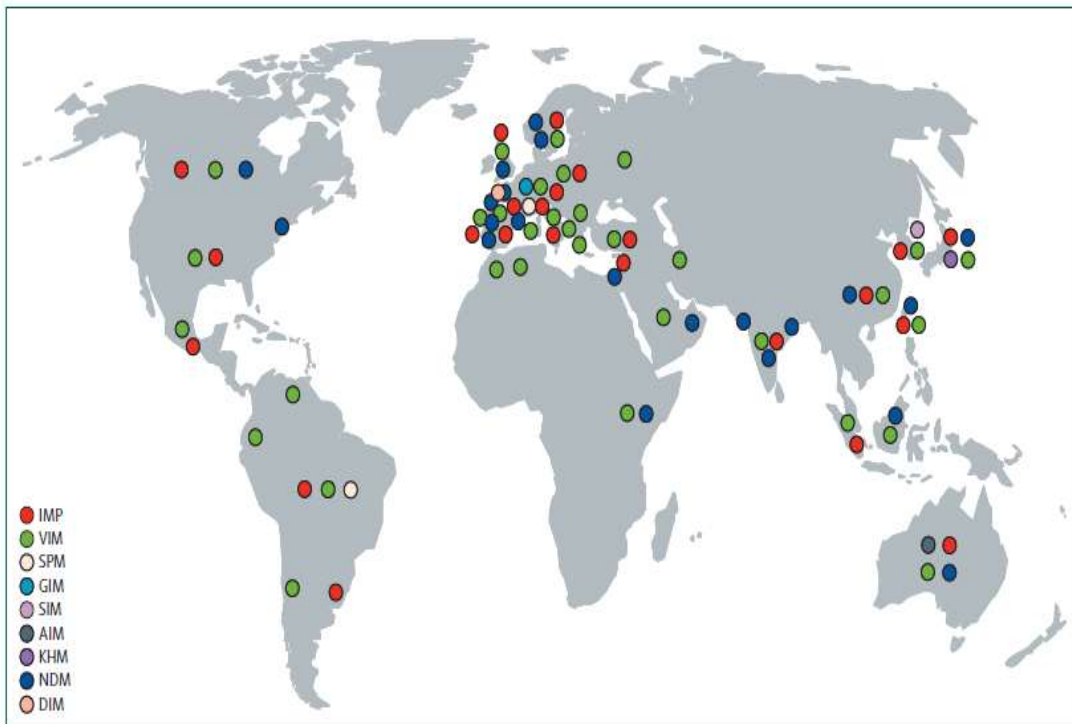
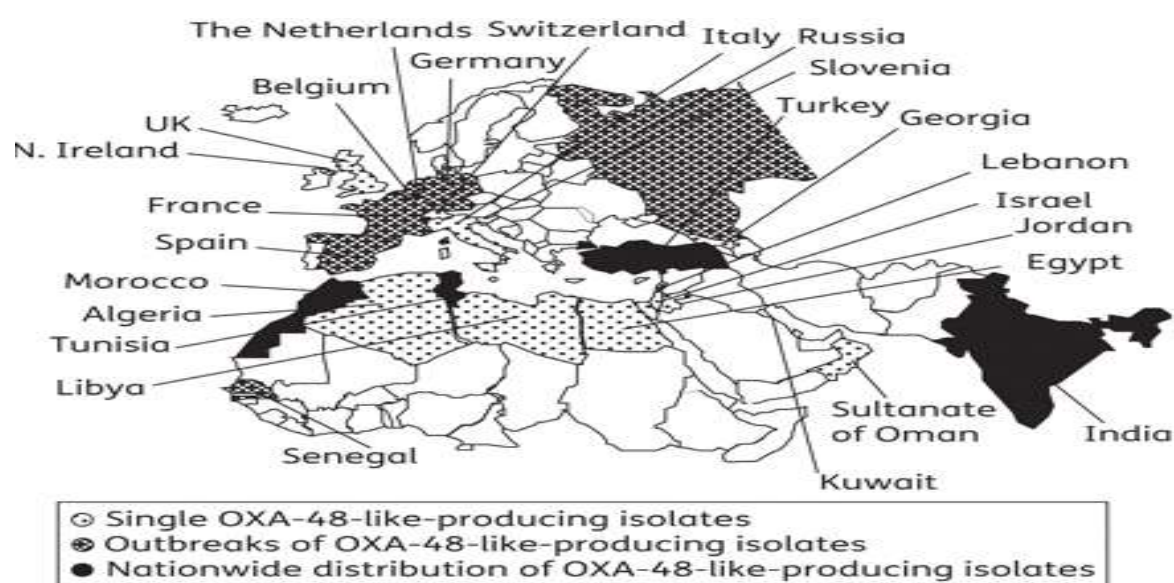


Figure 2: Worldwide dissemination of different types of metallo-β-lactamases

8.2.3 OXA-καρβαπενεμάσες

Οι OXA- καρβαπενεμάσες αποτελούν υποκατηγορία της μοριακής τάξης D κατά Ambler , ομάδα που περιλαμβάνει ένζυμα OXA (με δράση οξακιλλινάσης) που παρουσίαζαν μικρή ή μεγάλη υδρολυτική ικανότητα έναντι των καρβαπενεμών. [304, 310]. Η OXA-48 είναι ένζυμο που υδρολύει τις καρβεπενέμες σε επίπεδο πολύ υψηλότερο από εκείνο των άλλων OXA-καρβαπενεμασών . Η OXA-48 παρουσιάζει παρόμοια υδρολυτική ικανότητα με τις KPC. Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 2001 σε στέλεχος *K.pneumoniae* που απομονώθηκε σε Τούρκο ασθενή που νοσηλευόταν για λοίμωξη ουροποιητικού σε νοσοκομείο της Κωνσταντινούπολης [508]. Για πολλά χρόνια, όλα τα OXA-48 στελέχη προέρχονταν μόνο από την Τουρκία. Σχετικά πρόσφατα , στελέχη που παράγουν OXA-48 , άρχισαν να απομονώνονται σε περιοχές εκτός της Τουρκίας, όπως στη Μέση Ανατολή και στη Βόρεια Αφρική , περιοχές που μπορούν πια να θεωρηθούν ως δεύτερο ρεζερβουαρ. Στην Ευρώπη, έχουν γίνει αρκετές αναφορές στελεχών στην Ιβηρική χερσόνησο, στη Γαλλία,στη Γερμανία και το Βέλγιο και στις χώρες της Βαλτικής. Η OXA-48 εμφανίζει αρκετές παραλλαγές συνεπεία αμινοξικών υποκαταστάσεων . Οι παραλλαγές αυτές έχουν παραπλήσια ως προς τη OXA-48 υδρολυτική ικανότητα και χαρακτηρίζονται στο σύνολό τους ως καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48 (OXA-48-like-carbapenemases). Μερικές από αυτές είναι οι OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232. Η OXA-48 ,καθώς και οι παραλλαγές της, φαίνεται οτι προήλθαν από το σαπροφυτικό είδος *Shewanella* spp [509].



8.3 Ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και καρβαπενεμασών ή/και AmpCs

Η εισαγωγή στη θεραπευτική των καρβαπενεμών και η ευρεία χρήση τους για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από στελέχη που ήταν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, αντοχή ως επί το πλείστον οφειλόμενη στην παρουσία των ESBLs, οδήγησε μέσω της πίεσης φυσικής επιλογής στην ανάδυση στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες. Πολλά από αυτά τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη εξακολουθούν να παράγουν παράλληλα και ESBLs. Τα γονίδια των ESBLs αρκετά συχνά φέρονται στα ίδια πλασμίδια με τα γονίδια των καρβαπενεμασών, οπότε υπάρχει η δυνατότητα συμμεταφοράς τους και οριζόντιας μεταφοράς.

Αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς εμφανίζουν και βακτήρια που φέρουν AmpC-β-λακταμάσες. Διακρίνονται σε χρωμοσωμικές και σε πλασμιδιακές. Οι χρωμοσωμικές AmpCs που ανιχνεύονται σε βακτήρια όπως *Enterobacter spp*, *C.freundii*, *M.Morgannii*, *S.marcenscens* και *P.aeruginosa* εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Η έκφρασή τους όμως μπορεί να ενισχυθεί είτε μετά από έκθεση σε συγκεκριμένους παράγοντες, οπότε μιλούμε για τις επαγωγίμες (inducible AmpCs) είτε μετά από μεταλλάξεις που οδηγούν σε μόνιμη αποκαταστολή (derepression) με αποτέλεσμα τη συνεχή υπερπαραγωγή αυτών των ενζύμων και την εμφάνιση φαινότυπου αντοχής [301]. Οι πλασμιδιακές AmpCs είναι ευρέως διαδεδομένες. Μπορούν να φέρονται σε πλασμίδια που επίσης περιέχουν γονίδια για EBSLs.

Το φαινόμενο αυτό της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs και καρβαπενεμασών ή και AmpCs απαντάται με όλο και μεγαλύτερη συχνότητα στα εντεροβακτηριακά, αλλά και στα αζυμωτικά βακτήρια, ιδίως στη *P.aeruginosa*.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, δεν υπάρχουν παγκόσμιες μελέτες για την ακριβή επίπτωση των στελεχών με ESBLs [571]. Πολύ περισσότερο, δεν υπάρχουν μελέτες για την ακριβή επίπτωση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs και καρβαπενεμασών / AmpCs. Ενδεικτικά, μπορούμε να αναφέρουμε το πόρισμα μιας παγκόσμιας πολυκεντρικής κλινικής δοκιμής (φάση III) για τη χορήγηση τιγκεκυκλίνης σε λοιμώξεις από *K.pneumoniae*, *E.coli* και *P.mirabilis* κατά τα έτη 2002-2006, στην οποία διαπιστώθηκε ότι 8,5% στελεχών ταυτόχρονα παρήγαγαν ESBLs και AmpCs και 2,2% των στελεχών ταυτόχρονα παρήγαγαν KPC και ESBLs [510]. Όσον αφορά

στην Ελλάδα,σε αναδρομική μελέτη βρέθηκε ότι το 67% των στελεχών *K.pneumoniae* , απομονωθέντων από βακτηριαμίες , που παρήγαγαν MBL, ταυτόχρονα έφεραν και το γονίδιο για SHV [511]. Πρόφατη μελέτη κατά το διάστημα 2015-2017 από την περιοχή των Σερρών, ανέδειξε τη συνύπαρξη ESBLs και καρβαπενεμασών σε στελέχη *K.pneumoniae* σε ποσοστό 44,2% [512].

Στη συνέχεια , ακολουθεί συνοπτική αναφορά στις αρχικές καταγραφές ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs και καρβαπενεμασών/AmpCs .

KPC-καρβαπενεμάσες και ESBLs: Η πρώτη αναφορά ταυτόχρονης παραγωγής KPC και ESBL αφορούσε το στέλεχος στο οποίο ανακαλύφθηκε και το πρώτο μέλος της οικογένειας KPC , η KPC-1. Επρόκειτο για στέλεχος *K.pneumoniae* που ανακαλύφθηκε το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα και εκτός από την πρωτοανακαλυφθείσα KPC-1 παρήγαγε ταυτόχρονα και SHV-29 [513]. Το 2002-2003 ,στη Νέα Υόρκη, καταγράφεται σε 2 νοσοκομεία επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-2 και SHV-11, ενώ λίγα χρόνια αργότερα στο Οχάιο , καταγράφηκε επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν KPC-3 και SHV-12 [514,515]. Το 2008 στη Φλόριντα,για την επιδημία σε μονάδα φροντίδας ηλικιωμένων ευθύνονταν στελέχη που παρήγαγαν ταυτόχρονα KPC-3 και SHV-11 , ενώ απομονώθηκαν και στελέχη που παρήγαγαν KPC-2 μαζί με 2 ESBLs (τη SHV-11 και τη SHV-33) και στελέχη θετικά για KPC-3 και SHV-7 [516]. Στις ΗΠΑ ,το 2010, στο πλαίσιο της πολυκεντρικής μελέτης του προγράμματος επιτήρησης SENTRY, απομονώθηκαν αρκετά στελέχη εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάσες και ESBLs [517]. Στον Καναδά το 2012, από τις πρώτες αναφορές για την εμφάνιση στελεχών που παράγουν KPC-καρβαπενεμάσες, αφορούσε σε στέλεχος απο ασθενή που πρωτίτερα είχε νοσηλευτεί στην Ελλάδα . Το στέλεχος αυτό παρήγαγε KPC-2 και SHV-12 [518]. Στη Λατινική Αμερική, πρώτες αναφορές σε ταυτόχρονη παραγωγή KPC και ESBLs , αφορούν σε στελέχη *K.pneumoniae* : το 2005 στην Κολομβία (KPC-2 και SHV), το 2006 στη Βραζιλία (KPC-2 και SHV-11 και CTX-M-2 , KPC-2 και CTX-M-2), και στην Αργεντινή (KPC-2 και SHV και PER-2) [519-521]. Στην Κίνα, η πρώτη αναφορά για KPC-καρβαπενεμάσες , αφορά σε στέλεχος *K.pneumoniae*, που παρήγαγε KPC-2 και SHV-12 [522] Στην Ευρώπη, και συγκεκριμένα στην Ιταλία , απομονώθηκαν το 2008 στελέχη

K.pneumoniae που ταυτόχρονα παρήγαγαν KPC-3 και SHV-11 και OXA-9 [523]. Το 2009, στην Ισπανία απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* με ταυτόχρονη παραγωγή KPC-3 και CTX-M-10 [524]. Στη Γαλλία για πρώτη φορά εντοπίστηκε στέλεχος *E.coli* ST131 με ταυτόχρονη παραγωγή KPC-2 και CTX-M-15 [525]. Στην Ελλάδα, σημειώθηκε το 2007-2008 επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae*, που παρήγαγαν KPC-2 και SHV-12, ενώ το 2010-2011 καταγράφηκε επιδημία στην Κρήτη από στελέχη *E.coli*, που παρήγαγαν KPC-2 και CTX-M-1 [526,527].

Μεταλλο-β-λακταμάσες και ESBLs: Το 2008 στην Ιταλία αναφέρθηκε επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν SHV-5 και VIM-1 [528], ενώ σε άλλο μεγάλο νοσοκομείο της Ιταλίας απομονώθηκαν εντεροβακτηριακά, στα οποία συνυπήρχαν τα γονίδια SHV-12 και VIM-1 [529]. Στην Ισπανία, την περίοδο 2005-2006, ανιχνεύθηκαν κατά τη διάρκεια επιδημίας για πρώτη φορά στελέχη *K.pneumoniae* και *E.coli*, που ταυτόχρονα παράγουν SHV-12 και VIM-1 [530], ενώ μερικά χρόνια αργότερα εντοπίστηκαν στελέχη *E.cloacae* και *K.oxytoca*, που παράγουν ταυτόχρονα VIM-1 και CTX-M (CTX-M-3 ή CTX-M-9) [531]. Στη Γαλλία, το 2005 συνέβη επιδημία σε μονάδα μεταμοσχεύσεων από στελέχη *K.pneumoniae* που έφεραν ταυτόχρονα γονίδια για SHV-5 και VIM [532]. Στην Τουρκία, το 2006 απομονώθηκε στέλεχος *K.pneumoniae* που έφερε γονίδια CTX-M-15 και VIM-1 [533]. Στη Βόρεια Αφρική, και συγκεκριμένα στην Αλγερία, σημειώθηκε επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae*, που έφεραν ταυτόχρονα γονίδιο για την καρβαπενεμάση VIM-4, γονίδιο για την πλασμιδιακή κεφαλοσπορινάση CMY-4 και το γονίδιο για CTX-M-15 [534]. Στην Ταιβάν, αναφέρθηκε επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae*, που παρήγαγαν ταυτόχρονα IMP-8 και SHV-12 [535]. Στην Ελλάδα, σε αναδρομική μελέτη βρέθηκε ότι το 67% των στελεχών *K.pneumoniae*, απομονωθέντων από βακτηριαίμιες, που παρήγαγαν τη VIM-1, ταυτόχρονα έφεραν το γονίδιο για τη SHV-5 [511]. Σε στέλεχος *E.cloacae* βρέθηκαν ταυτόχρονα να εκφράζονται τα γονίδια για τη SHV2a και για τη VIM-4 [536]. Επιδημία σημειώθηκε σε νοσοκομείο της Κρήτης από στελέχη *E.coli*, που έφεραν ταυτόχρονα γονίδια VIM-1 και CTX-M [537].

Όσον αφορά στη NDM, αρκετά συχνά εντοπίζεται σε εντεροβακτηριακά που παράγουν ταυτόχρονα CTX-M-15. Η NDM πρωτοεμφανίστηκε στην Ινδία, σε μια περιοχή όπου η συχνότητα των ESBLs στα εντεροβακτηριακά ανέρχεται στο 70-90%

[538,539]. Παρομοίως, στα Βαλκάνια και στη Μέση Ανατολή, περιοχές που θεωρούνται δευτερεύον ρεζερβουάρ NDM, τα περισσότερα στελέχη που φέρουν NDM ταυτόχρονα παράγουν και CTX-M-15 [539-541]. Στην Πολωνία, μια μη-ενδημική χώρα για NDM-στελέχη, το διάστημα 2012-2014 συνέβη μια μεγάλη επιδημία, στην οποία στελέχη *K.pneumoniae* παρήγαγαν ταυτόχρονα NDM-1 και CTX-M-15 [542]. Σε ποσοστό >80% στελέχη εντεροβακτηριακών που παράγουν NDM υδρολύουν την αζτρεονάμη, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs (κυρίως CTX-M-15) ή/και AmpCs. [504,505,538,539]. Έμμεση ένδειξη ότι ένα MBL-θετικό βακτήριο δεν παράγει μόνο MBL, αλλά παράγει ταυτόχρονα και άλλες β-λακταμάσες είναι όταν παρατηρούμε ότι αυτό είναι ανθεκτικό στην αζτρεονάμη. Οι MBLs δεν υδρολύουν την αζτερονάμη.

OXA-καρβαπενεμάσες και ESBLs: Η OXA-48 ανακαλύφθηκε σε στέλεχος *K.pneumoniae* από Τούρκο ασθενή που επίσης έφερε και γονίδιο για την SHV2a [508]. Λίγο αργότερα, σημειώθηκε στην Τουρκία επιδημία από *K.pneumoniae* που έφερε ταυτόχρονα γονίδια για SHV-12, CTX-M-15 και OXA-48 [544]. Το 2009 για πρώτη φορά στις ΗΠΑ απομονώθηκε στέλεχος *K.pneumoniae* που παρήγαγε OXA-48. Το στέλεχος αυτό επίσης παρήγαγε CTX-M-9 [543]. Το 2012 στις ΗΠΑ απομονώθηκαν από 2 ασθενείς ένα στέλεχος *K.pneumoniae* που παρήγαγε ταυτόχρονα OXA-48 και CTX-M-9 και ένα στέλεχος *K.pneumoniae* που παρήγαγε ταυτόχρονα OXA-181 (μια τυπου OXA-48 καρβαπενεμάση) και CTX-M-15 [545].

AmpC-β-λακταμάσες και ESBLs: Οι πρώτες αναφορές για πλασμιδιακές AmpC-β-λακταμάσες έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [546,547]. Ήδη από το 1997, με το παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης MYSTIC, άρχισε να διαφαίνεται η αυξανόμενη επίπτωση της συνύπαρξης ESBLs και AmpCs [548]. Πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ το 2000 ανέδειξε τη συνύπαρξη ESBLs και AmpCs σε στελέχη *K.pneumoniae* σε ποσοστό 2% [549]. Μελέτη από την Κορέα κατά το διάστημα 2002-2004 καταγράφει τη συνύπαρξη ESBLs και πλασμιδιακών AmpCs σε στελέχη *K.pneumoniae* σε ποσοστό 8,7% [550]. Σε αναδρομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε νοσοκομείο της Σεουλ βρέθηκε ότι το 7,14% των στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν από βακτηριαμίες το διάστημα 1998-2002 παρήγαγαν ταυτόχρονα πλασμιδιακές AmpCs και SHV-12 [551]. Μελέτη από το

Ηνωμένο Βασίλειο κατά το διάστημα 2004-2005 έδειξε την παραγωγή πλασμιδιακής AmpC (της τάξης CIT) σε στελέχη *E.coli* που επίσης παρήγαγαν ESBL . Το 30% των στελεχών *E.coli* παρήγαγαν ταυτόχρονα CIT και CTX-M-15 [552]. Σε μελέτη από την Ινδία, στελέχη που ταυτόχρονα παρήγαγαν AmpCs και ESBLs συνιστούν το 6,59% και κυρίως αφορούσαν στελέχη *E.coli* και *K.pneumoniae* [553]. Σε πρόσφατη μελέτη από τη Βαρκελώνη της Ισπανίας, η ταυτόχρονη παραγωγή AmpCs και ESBLs σε στελέχη *E.coli* ανέρχεται σε 7,9% [554]. Η συνύπαρξη πλασμιδιακών AmpCs και ESBLs σε στελέχη εντεροβακτηριακών είχε αναδειχθεί και από μία άλλη μελέτη από την Ισπανία [555]. Επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae* με ταυτόχρονη παραγωγή FOX-7 και SHV-12 σημειώθηκε στην Ιταλία σε ΜΕΘ νεογνών την περίοδο 2008-2010. Στην Κορέα το 2004 καταγράφηκε επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae*, που παρήγαγαν ταυτόχρονα DHA-1 και SHV-12 [557]. Την ίδια εποχή, επιδημία από στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενεμένες σημειώθηκε στη Σεουλ και αφορούσε σε στελέχη *Serratia marcescens* με υπερέκφραση της χρωμοσωμικής AmpC σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη παραγωγή CTX-M-22 και την απώλεια πορίνης [558]. Στην Κίνα απομονώθηκαν στελέχη *E.coli* που παρήγαγαν ταυτόχρονα την πλασμιδιακή AmpC (τη CMY-48) και ESBL (τη CTX-M-14) , ενώ εντοπίστηκε και στέλεχος *E.coli* που εκτός από τις παραπάνω λακταμάσες , παρήγαγε επιπλέον και NDM-1 [559]. Άλλη μία επιδημία από στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής VIM -4 συνέβη το 2005 στην Τυνησία και αφορούσε στελέχη που επίσης παρήγαγαν CTX-M-15 και την πλασμιδιακή CMY-4 [560]. Στην Τυνησία ,επίσης, μια δεκαετία αργότερα απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* που παρήγαγαν OXA-τύπου καρβαπενεμάσες μαζί με pAmpC (CMY-4) και ESBL (CTX-M-15) [561].

ESBLs και πολλαπλές β-λακταμάσες: Από τα τέλη της πρώτης δεκαετίας του 2000, έχουν αρχίσει να εντοπίζονται στελέχη που παράγουν συγχρόνως δύο ή περισσότερους τύπους καρβαπενεμασών, ενώ φέρουν επίσης ESBLs , χωρίς ή και με πλασμιδιακή AmpC. Το γεγονός αυτό υποδηλοί την επίταση του φαινομένου της αντοχής ,καθώς τα στελέχη αυτά εμφανίζονται ικανά να συσσωρεύουν πολλά πλασμίδια και να έχουν πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής. Παραδείγματα απομόνωσης τέτοιων στελεχών είναι: Στην Ιταλία το 2009-2011 σημειώθηκε

επιδημία από ανθεκτικά στελέχη *K.pneumonia*. Τότε εντοπίστηκαν στελέχη που παρήγαγαν 2 τύπους καρβαπενεμασών (KPC-2 και VIM-1) ,αλλά ταυτόχρονα και SHV-12 [562]. Επίσης, την ίδια περίοδο, στην Τοσκάνη απομονώθηκε ένα στέλεχος *K.pneumonia* που ταυτόχρονα παρήγαγε KPC-3 και VIM-1 ,αλλά και 2 ESBLs (SHV-12 και CTX-M-15) [563]. Στην Ινδία εντοπίστηκε το 2010 στέλεχος *K.pneumonia* με ταυτόχρονη παραγωγή KPC-2 , NDM-1, CTX-M-15 και SHV-12 [564]. Στην Ελβετία το 2013 εντοπίστηκε στέλεχος *K.pneumoniae* από ασθενή που είχε προηγουμένως νοσηλευθεί σε ΜΕΘ της Σερβίας , το οποίο ταυτόχρονα παρήγαγε 2 τύπους καρβαπενεμασών (NDM-1 και OXA-48) , την πλασμιδιακή κεφαλοσπορινάση CMY-16 ,καθώς και CTX-M-15 [565]. Σε επιδημία στην Τυνησία τα έτη 2015-2016, απομονώθηκαν στελέχη *K.pneumoniae* με ταυτόχρονη παραγωγή OXA-48 και NDM-1, CMY-16 ,καθώς και CTX-M-15 [561]. Στην Ελλάδα , πρώτη περιγραφή εντεροβακτηριακού με δυνατότητα συνάθροισης πολλαπλών μηχανισμών αντοχής αφορά ένα στέλεχος *K.pneumoniae*, που ταυτόχρονα παρήγαγε VIM-19 και KPC-2, CMY-2 και CTX-M-15 [566].

8.4 Οι «κρυμμένες» ESBLs στα φαινοτυπικά τεστ

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις ταυτόχρονης παραγωγής β-λακταμασών γίνεται κατανοητό ότι η παρουσία των ESBLs κρύβεται κάτω από την παραγωγή των πιο ισχυρών υδρολυτικών ενζύμων, των καρβαπενεμασών και των AmpC- β – λακταμασών, γεγονός που δυσχεραίνει τη φαινοτυπική ανίχνευση τους.

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης των ESBLs που βασίζονται στα βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των ενζύμων είναι σε γενικές γραμμές αποτελεσματικές , όταν εφαρμόζονται σε στελέχη που παράγουν αποκλειστικά ESBLs, με τη δοκιμασία των συνδυασμένων δίσκων (Combined Disk Test) να έχει την καλύτερη επίδοση. Είναι και η δοκιμασία άλλωστε που συστήνεται από το CLSI , είναι προτυποποιημένη μόνο για στελέχη *E.coli*, *Klebsiella* spp, *P.mirabilis* [380-386,390-392,398]. Όμως , οι ESBLs έχουν διασπαρεί και εκτός των *E.coli*, *Klebsiella* spp και *P.mirabilis*. Απομονώνονται με αυξανόμενη συχνότητα σε όλα τα είδη των εντεροβακτηριακών. Παράλληλα, ESBLs αρχίζουν να αναγνωρίζονται και σε στελέχη αζιμωτικών, κυρίως

στη *P.aeruginosa* [319,330-338,356,454,464,567,570]. Και η επιδημιολογία των ανθεκτικών στελεχών γίνεται ακόμη πιο σύνθετη , καθώς προκύπτουν στελέχη που εκτός από ESBLs παράγουν ταυτόχρονα AmpCs ή/και καρβαπενεμάσες.

Κατά συνέπεια, οι φαινοτυπικές μέθοδοι , συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας CDT που συστήνει το CLSI, καθίστανται λιγότερο ακριβείς. Τόσο οι καρβαπενεμάσες όσο και οι AmpCs υδρολύουν τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις δοκιμασίες και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό , που είναι ο αναστολέας που συνήθως χρησιμοποιείται . Οι ESBLs δεν ανιχνεύονται και παραμένουν «κρυμμένες». Η συχνότητά τους υποεκτιμάται.

Γιαυτό το λόγο υπάρχει η ανάγκη για τη βελτίωση των φαινοτυπικών μεθόδων ανίχνευσης ESBLs , ώστε να ανιχνεύονται με ακρίβεια οι ESBLs ακόμη και αν ταυτόχρονα παράγονται καρβαπενεμάσες ή AmpCs. Σε μια προσπάθεια να υπερκεραστεί η δράση των AmpCs και των KPC- καρβαπενεμασών έχουν προταθεί στο παρελθόν εναλλακτικά φαινοτυπικά τεστ , καθώς και η χρήση βορονικού οξέος . Το βορονικό οξύ (BA) είναι αναστρέψιμος αναστολέας των KPC καρβαπενεμασών και των AmpC-β- λακταμασών και η χρήση του οδήγησε στην αποκάλυψη ESBLs σε στελέχη εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παράγουν AmpCs ή KPC-καρβαπενεμάσες [380-386,446] . Οι ESBLs ,όμως, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με MBLs ή με ταυτόχρονη παραγωγή MBLs και KPCs.

Η ανίχνευση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs σε ανθεκτικά στελέχη είναι σημαντική για επιδημιολογικούς σκοπούς και για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε χώρες με χαμηλούς πόρους.

Στο ειδικό μέρος της διατριβής προτείνουμε μια τροποποίηση στην προτυποποιημένη δοκιμασία CDT που συστήνει το CLSI για την ανίχνευση των ESBLs, ώστε να υπερκεραστεί το πρόβλημα που δημιουργείται από την ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και άλλων β-λακταμασών και να αποκαλυφθούν οι «κρυμμένες» ESBLs. Προτείνουμε τη σύγχρονη εφαρμογή βορονικού οξέος , αναστολέα των KPC καρβαπενεμασών και των AmpCs, και του EDTA , χηλικού υποκαταστάτη που αναστέλλει τις MBLs [382-386,435,444-446].

II. Ειδικό Μέρος

Εισαγωγή – σκοποί μελέτης

Η επίπτωση των λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια συνεχώς αυξάνεται σε όλο τον κόσμο τόσο στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας (νοσοκομεία, γηροκομεία, μονάδες μακροχρόνιας περίθαλψης) όσο και στην κοινότητα. Είναι μείζον θέμα δημόσιας υγείας παγκόσμια. Στην Ευρώπη 25000 θάνατοι ετησίως οφείλονται σε λοιμώξεις από ανθεκτικά gram-αρνητικά βακτήρια με άμεσο και έμμεσο οικονομικό κόστος περίπου 1,5 δισ. ευρώ. Η θεραπεία μιας λοίμωξης από ανθεκτικό gram-αρνητικό βακτήριο είναι περισσότερο δαπανηρή και παρατείνει τη νοσηλεία κατά 6-13 ημέρες, ενώ ο κίνδυνος θανάτου είναι διπλάσιος σε σχέση με λοιμώξεις από ευαίσθητα βακτήρια [19-25].

Θεμέλιος λίθος της θεραπείας των λοιμώξεων αποτελούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αποτελούν και την πρώτη επιλογή στην εμπειρική αγωγή. Είναι φάρμακα βακτηριοκτόνα, με καλή φαρμακοκινητική και λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες. Επί του παρόντος, ο κύριος μηχανισμός άμυνας των gram-αρνητικών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η παραγωγή των β-λακταμασών [281-284].

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα χρωμοσωμικής ή πλασμιδιακής προέλευσης που αδρανοποιούν τις β-λακτάμες υδρολύοντας το β-λακταμικό δακτύλιο τους [287-289]. Μέχρι σήμερα περισσότερες από 1000 β-λακταμάσες έχουν αναγνωρισθεί. Την τελευταία 10ετία σημειώθηκαν μεγάλες ποσοστιαίες αυξήσεις σε κάποιες από τις οικογένειες των β-λακταμασών, ακόμη και σε επίπεδα άνω του 150% [312]. Για τη μελέτη και την ταξινόμηση των β-λακταμασών στις μέρες χρησιμοποιείται ένα μικτό σύστημα, που συνδυάζει τη μοριακή ταξινόμηση «κατά Ambler» με τη λειτουργική ταξινόμηση «κατά Bush, Jacoby και Medeiros» [290-292].

Λίγο πριν τα μέσα της δεκαετίας του 1980, άρχισαν να απομονώνονται στελέχη εντεροβακτηριακών ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς οδηγώντας σε θεραπευτική αστοχία και σε μείωση των θεραπευτικών επιλογών. Το φαινόμενο αυτό κλιμακώνεται με την πάροδο των ετών και στις μέρες μας υπάρχουν περιοχές στον πλανήτη, όπου αυτή η κατάσταση είναι υπερενδημική πχ Ινδία (80%), Κίνα (60%), Τουρκία (>50%). Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του ECDC, στις χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ η μέση αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς πλησιάζει το 20%. Η

Ελλάδα βρίσκεται στις υψηλότερες θέσεις αντοχής στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς και συγκεκριμένα το ποσοστό είναι περίπου 36% [196,207,214,215,226,319].

Σύντομα μετά την απομόνωση των πρώτων ανθεκτικών στις κεφαλοσπορίνες γ' γενεάς στελεχών, αποδείχθηκε ότι η αντοχή αυτή οφειλόταν ως επί το πλείστον στην εμφάνιση νέων β-λακταμασών. Οι νέες αυτές β-λακταμάσες παρουσίαζαν διευρυμένη υδρολυτική ικανότητα ,και γιαυτό το λόγο ονομάστηκαν β- Λακταμάσες Εκτεταμένου Φάσματος (Extended Spectrum Beta Lactamases, ESBLs). Μέχρι σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον 500 ESBLs . Με βάση τα δύο επικρατούντα ταξινομικά συστήματα, ως ESBLs χαρακτηρίζονται τα ένζυμα των λειτουργικών ομάδων 2be και 2de κατά Bush - Jacoby ή τα ένζυμα των μοριακών τάξεων A και D κατά Ambler [290-292,312].

Οι ESBLs υδρολύουν τις πενικιλίνες , τις κεφαλοσπορίνες 1^{ης} και 2^{ης} γενεάς, τις οξυ-ιμινοκεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες .Δεν υδρολύουν τις κεφαμυκίνες (κεφοξιτίνη, κεφοτετάνη) και τις καρβαπενέμες, ενώ αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ,την ταζοβακτάμη και τους άλλους αναστολείς β-λακταμασών . Έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο. Τα λειτουργικά και βιοχημικά αυτά χαρακτηριστικά τους αξιοποιούνται στην εργαστηριακή ανίχνευσή τους, και ιδίως το γνώρισμά τους να αναστέλλονται από το κλαβουλανικό [312,319].

Οι ESBLs εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε στελέχη εντεροβακτηριακών . Η πρώτη ESBL , SHV τύπου, ανιχνεύθηκε σε στέλεχος *Klebsiella* spp [313] . Εντεροβακτηριακά που συχνότερα εκφράζουν ESBLs είναι τα : *E.coli* , *Klebsiella* spp , και *P.mirabilis*. Τα μικρόβια αυτά αποτελούν σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα και τα τελευταία έτη καταλαμβάνουν τις πρώτες θέσεις στη συχνότητα απομόνωσης, ιδιαίτερα στην Ελλάδα (WHONET2016). Όμως,η παραγωγή ESBLs εξαπλώθηκε και εκτός των εντεροβακτηριακών , καθώς συχνά απομονώνονται στελέχη αζιμωτικών βακτηρίων των γένων *P.aeruginosa* και *A.baumannii*, που φέρουν γονίδια ESBLs.

Η συχνότητα απομόνωσής στελεχών που παράγουν ESBLs είναι μεγάλη κυρίως σε χώρες της Ανατολικής και Νότιας Ευρώπης, Νότιας και Ν.Α.Ασίας, καθώς και στην Τουρκία . Μέχρι πολύ πρόσφατα, οι περισσότερες κατηγορίες των ενζύμων αυτών ανιχνεύονταν στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όμως τα τελευταία χρόνια έχουν

πληθύνει οι αναφορές για απομόνωση στελεχών που παράγουν ESBLs από ασθενείς κοινότητας. Έχει αναφερθεί ότι η φορεία με στελέχη που παράγουν ESBLs είναι δυνατόν να ανιχνεύεται για διάστημα ως και 2 έτη. Η φορεία με ανθεκτικά στελέχη που παράγουν ESBLs είναι παράγοντας κινδύνου για εκδήλωση λοίμωξης αλλά και για διασπορά από άτομο σε άτομο. Βακτήρια που παράγουν ESBLs έχουν να αρχίσει να απομονώνονται και σε οικοσυστήματα εκτός νοσοκομείου πχ σε αστικά λύματα, σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, σε υδάτινες απορροές ,σε κτηνοτροφεία ακόμη και σε τρόφιμα , μα και στο αστικό νέφος [70-74,281-284,324-326,355-358].

Οι επικρατέστεροι τύποι των ESBLs όσον αφορά στη συχνότητα απομόνωσης , την αριθμητική επέκταση των μελών και τη γεωγραφική διασπορά είναι : οι SHV-ESBLs, οι TEM-ESBLs ,οι OXA-ESBLs και οι CTX-Ms. Λιγότερο συχνοί είναι οι τύποι: PER, VEB, BEL, TLA, GES, SFO-1, BES-1. Στην πλειοψηφία τους, πρόκειται για πλασμιδιακές β-λακταμάσες.Τα γονίδια τους φέρονται σε μεταθετά στοιχεία και ιντεγκρόνια , γεγονός που διευκολύνει τη διάδοσή τους [319,343,359].

Οι CTX-Ms αποτελούν τον πιο διαδεδομένο τύπο ESBL , από τις αρχές του 2000 μέχρι σήμερα και ανιχνεύονται σε κάθε κατοικημένη ήπειρο οδηγώντας σε σημαντική αύξηση όχι μόνο των νοσοκομειακών λοιμώξεων αλλά και των ανθεκτικών λοιμώξεων κοινότητας . Το διάστημα 2005-2010 σημειώθηκε 100% αύξηση σε νέα είδη CTX-Ms . Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 166 μέλη. Απαντώνται σε τουλάχιστον 26 είδη βακτηρίων. Απομονώνονται όλο και συχνότερα αλλάζοντας τον επιδημιολογικό χάρτη , σχεδόν εκτοπίζοντας τους άλλους τύπους των ESBLs [194,196,214-231,312,343]. Οι πιο διαδεδομένες παραλλαγές των CTX-Ms είναι η CTX-M-15 και η CTX-M-14, των οποίων η διασπορά έχει συσχετιστεί με επιτυχημένους κλώνους. Ειδικά η εξάπλωση της CTX-M-15 σχετίζεται με τον κλώνο *E.coli* ST131 . Στην Ελλάδα φαίνεται ότι επικρατούν οι παραλλαγές CTX-M-15 και CTX-M-3 [335-349].

Πολλές φορές τα βακτήρια που παράγουν ESBLs, εμφανίζονται ανθεκτικά και σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών εκτός των β-λακταμών , γιατί τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ESBLs εντοπίζονται σε μεταθετά στοιχεία αυξημένης κινητικότητας (πλασμίδια, τρανσποζόνια) που επίσης μεταφέρουν γονίδια αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, τη σουλφομεθοξαζόλη ή και τις κινολόνες. Η συνύπαρξη αυτή των

γονιδίων των ESBLs με τους άλλους τύπους γονιδίων αντοχής είναι μείζονος σημασίας γιατί έχει οδηγήσει όχι μόνο στην ευρεία οριζόντια διασπορά των γονιδίων αντοχής μεταξύ των βακτηρίων ίδιου ή διαφορετικού γένους (horizontal gene transfer, HGT), αλλά και στη δυσχερή αντιμετώπιση των λοιμώξεων καθώς περιορίζονται οι θεραπευτικές επιλογές [196,436].

Σύμφωνα με πρόσφατη ανακοίνωση του Π.Ο.Υ. (28 Φεβρουαρίου 2017), τα εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs καταλαμβάνουν την τρίτη θέση στη λίστα των 12 σοβαρότερων βακτηριακών απειλών (τις πρώτες θέσεις κατέχουν τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A.baumannii* και *P.aeruginosa*). Επίσης, κατά το CDC, η παραγωγή των ESBLs στα εντεροβακτηριακά συνιστά «σοβαρή απειλή», καθώς υπολογίζεται ότι προκαλεί 26000 νοσοκομειακές λοιμώξεις και 1700 θανάτους ετησίως [2,19,51,427]. Γιαυτό το λόγο, η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευσή τους είναι σημαντική τόσο για τη θεραπεία όσο και για επιδημιολογικούς σκοπούς και για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων.

Η ανίχνευση της παραγωγής των ESBLs γίνεται στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο με συμβατικές (κλασικές) και μοριακές τεχνικές. Ειδικότερα, η φαινοτυπική ανίχνευση, που υπάγεται στις κλασικές εργαστηριακές τεχνικές, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την επιδημιολογία και τον έλεγχο των λοιμώξεων. Απαρτίζεται από δύο βήματα: το πρώτο βήμα αφορά στην αρχική εκτίμηση της ευαισθησίας του εξεταζόμενου στελέχους, και στην περίπτωση που τίθεται η υποψία παραγωγής ESBLs, πρέπει να ακολουθήσει το δεύτερο βήμα της φαινοτυπικής επιβεβαίωσης. Σε γενικές γραμμές, οι φαινοτυπικές δοκιμασίες επιβεβαίωσης είναι ακριβείς, με τη δοκιμασία των συνδυασμένων δίσκων (Combination Disk Test, CDT) να έχει την καλύτερη επίδοση. Γιαυτό το λόγο το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) συστήνει για την ανίχνευση των ESBL τη δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων [378].

Το CLSI ESBL Confirmatory Test είναι προτυποποιημένο για *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* και *Proteus mirabilis*. Στη δοκιμασία αυτή συγκρίνονται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής γύρω από δίσκους κεφταζιδίμης και κεφτοταξίμης με και χωρίς κλαβουλανικό οξύ. Είναι μέθοδος αντικειμενική. Η χρήση δύο κεφαλοσπορινών διασφαλίζει την ανίχνευση των ESBLs [378].

Οι ESBLs απαντώνται με αυξανόμενη συχνότητα σε όλα τα είδη των εντεροβακτηριακών, ενώ έχουν αρχίσει να εμφανίζονται και σε στελέχη αζιμουβικών βακτηρίων, όπως στη *P.aeruginosa*. Η αυξανόμενη συχνότητα απομόνωσης στελεχών που παράγουν ESBLs οδήγησε στην ευρεία χρήση των καρβαπενεμών. Αυτό είχε ως συνέπεια να ασκηθεί πίεση επιλογής και να προκύψουν βακτηριακά στελέχη που εκτός από ESBLs φέρουν γονίδια και για άλλους τύπους β-λακταμασών. Κατά συνέπεια, βακτήρια που παράγουν ESBLs μπορεί ταυτόχρονα να εκφράζουν γονίδια για σερινο-καρβαπενεμάσες ή /και μέταλλο-β-λακταμάσες. Οι σερινο-καρβαπενεμάσες ανήκουν στη μοριακή τάξη A (πχ KPC, GES) και στη μοριακή τάξη D (πχ OXA-23, OXA-48), έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες (πχ VIM, IMP, NDM-1) ανήκουν στη μοριακή τάξη B, χρειάζονται για να δρουν δισθενή ιόντα στο ενεργό τους κέντρο και υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες, εκτός από την αζτερονάμη. Δεν υπάρχουν μελέτες για την ακριβή επίπτωση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs και καρβαπενεμασών. Όσον αφορά στην Ελλάδα, χώρα με ενδημικότητα ως προς την παραγωγή καρβαπενεμασών, σε αναδρομική μελέτη βρέθηκε ότι ταυτόχρονα παρήγαγαν MBL και ESBL το 67% των στελεχών *K.pneumoniae*, απομονωθέντων από βακτηριαμίες [511]. Πρόφατη μελέτη κατά το διάστημα 2015-2017 από την περιοχή των Σερρών, ανέδειξε τη συνύπαρξη ESBLs και καρβαπενεμασών σε στελέχη *K.pneumoniae* σε ποσοστό 44,2% [512].

Ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες εμφανίζονται, επίσης, στελέχη που παράγουν AmpC-β-λακταμάσες. Οι AmpC-β-λακταμάσες έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, υδρολύουν τις κεφαμυκίνες και όλες τις κεφαλοσπορίνες, εκτός από την κεφεπίμη, και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό. Υπάρχουν χρωμοσωμικές και πλασμιδιακές AmpCs. Δεν υπάρχουν μελέτες για την ακριβή επίπτωση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs και AmpC-β-λακταμασών. Μέχρι τώρα, μελέτες από διάφορα κέντρα αναφέρουν ότι η συνύπαρξη ESBLs και AmpCs κυμαίνεται σε επίπεδα 5-8% [510,551-555].

Η συνύπαρξη των ESBLs με τις AmpC-β-λακταμάσες, τις σερινοκαρβαπενεμάσες και τις μέταλλο-β-λακταμάσες δυσχεραίνει τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs, καθώς τόσο οι καρβαπενεμάσες όσο και οι AmpCs υδρολύουν τα υποστρώματα,

που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες , ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ [377]. Οι ESBLs παραμένουν «κρυμμένες». Καθώς η επιδημιολογία ως προς τη διασπορά των ESBLs γίνεται όλο και πιο σύνθετη, γιατί αναδεικνύονται στελέχη με ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και καρβαπενεμασών ή/και AmpCs, οι κλασικές φαινοτυπικές μέθοδοι πλέον δεν επαρκούν, καθώς υποεκτιμούν την συχνότητα των ESBLs. Δημιουργείται , επομένως, η ανάγκη για μία εναλλακτική φαινοτυπική δοκιμασία ,κατά την οποία θα αποκαλύπτονται οι «κρυμμένες» αυτές ESBLs, έτσι ώστε να μην χάνονται πολύτιμα επιδημιολογικά δεδομένα και να εφαρμόζονται καταλλήλως τα μέτρα ελέγχου λοιμώξεων.

Σκοποί της παρούσας διατριβής είναι :

- 1) Η αξιολόγηση του προτυποποιημένου CLSI ESBL Test στη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs στα εντεροβακτηριακά , όταν συμβαίνει να παράγονται ταυτόχρονα επιπρόσθετοι τύποι β-λακταμασών (πλασμιδιακές AmpC-β-λακταμάσες, σερινοκαρβαπενεμάσες, μεταλλο-β-λακταμάσες) ή επί υπερπαραγωγής των χρωμοσωμικών AmpCs.
- 2) Να προτείνουμε τροποποιήσεις στο προτυποποιημένο CLSI ESBL Test προσδοκώντας στη βελτίωση της απόδοσής του. Οι τροποποιήσεις αφορούν στη σύγχρονη προσθήκη βορονικού οξέος και EDTA στους δίσκους κεφοταξίμης και κεφταζιδίμης με ή χωρίς κλαβουλανικό. Το βορονικό οξύ (BA) είναι αναστρέψιμος αναστολέας των KPC-καρβαπενεμασών και των AmpC-β- λακταμασών και η χρήση του οδήγησε στην αποκάλυψη ESBLs σε στελέχη εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παράγουν AmpCs ή KPC-καρβαπενεμάσες [380-386,446]. Οι ESBLs ,όμως, είναι δυνατόν να παράγονται σε στελέχη με παραγωγή MBLs ή ακόμη και ταυτόχρονη παραγωγή MBLs και KPCs. Το EDTA είναι χηλικός υποκαταστάτης που αναστέλλει τις μέταλλο-β-λακταμάσες δεσμεύοντας τα ιόντα ψευδαργύρου που είναι απαραίτητα για τη δράση τους [435,444-446]. Η υπόθεση που διερευνούμε είναι αν η σύγχρονη προσθήκη αυτών των αναστολέων στους δίσκους των αντιβιοτικών θα οδηγήσει στην αποκάλυψη των «κρυμμένων» ESBLs σε εντεροβακτηριακά που παράγουν ταυτόχρονα καρβαπενεμάσες ή AmpCs

3) Το Το CLSI συστήνει το προτυποποιημένο τεστ για την ανίχνευση των ESBLs στα εντεροβακτηριακά. Η υπόθεση , που επίσης, διερευνούμε είναι αν η τροποποιημένη αυτή μέθοδος συντελεί στην αποκάλυψη των «κρυμμένων» ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa*. Η *P.aeruginosa* αποτελεί κύριο αίτιο σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων λόγω της εγγενούς αντοχής της ,αλλά και της ικανότητάς της να αποκτά επιπλέον μηχανισμούς αντοχής. Η παραγωγή ESBLs περιγράφεται όλο και συχνότερα σε στελέχη *P.aeruginosa*. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της αντοχής της *P.aeruginosa* στις καρβαπενέμες, που ως επι το πλείστον οφείλεται στην παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών. Στην Ελλάδα ειδικότερα η αντοχή αυτή αφορά στην παραγωγή VIM [260-264]. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει προτυποποιημένη φαινοτυπική μέθοδος ανίχνευσης ESBLs στη *P.aeruginosa* και οι υπάρχουσες μέθοδοι υποεκτιμούν τη συχνότητα των ESBLs [464-466,568].

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν και αξιολογήθηκαν οι 2 υπό σύγκριση φαινοτυπικές δοκιμασίες τόσο σε στελέχη εντεροβακτηριακών όσο και σε στελέχη *P.aeruginosa*, που προέρχονται από τις συλλογές μικροβίων που διαθέτει το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία σε μία τουλάχιστον καρβαπενέμη και απομονώθηκαν από καλλιέργειες βιολογικών δειγμάτων από ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν σε ελληνικά νοσοκομεία. Το υλικό αυτό έχει εφοδιαστεί με κωδικούς και έχει μετατραπεί σε ανώνυμο.

Η διατριβή χωρίστηκε σε 2 μέρη:

Α' μέρος: εφαρμόζονται οι 2 υπο σύγκριση φαινοτυπικές μέθοδοι σε στελέχη εντεροβακτηριακών.

Β' μέρος: εφαρμόζονται οι 2 μέθοδοι σε στελέχη *P.aeruginosa*.

1.Υλικό και μέθοδοι

1.1 Βακτηριακά στελέχη

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν στελέχη εντεροβακτηριακών και στελέχη *P.aeruginosa*, που συνελέγησαν από επτά ελληνικά νοσοκομεία κατά τη χρονική περίοδο 2007 ως 2014 :

Γενικό Νοσοκομείο Σερρών, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΑΧΕΠΑ», Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά «Τζάνειο», Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας και Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Ευαγγελισμός».

Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από καλλιέργειες βιολογικών δειγμάτων, κυρίως αίματος και ούρων, όπως επίσης και τραυμάτων, πύου, βρογχικών εκκρίσεων και κατακλίσεων.

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν :

A) 301 κλινικά στελέχη εντεροβακτηριακών που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς (1 στέλεχος ανά ασθενή) .Το σκεπτικό της επιλογής τους ήταν να συμπεριληφθεί ένας ικανός αριθμός στελεχών, μεταξύ των οποίων κάποια που να είναι εκφραστές ποικίλων ισχυρών β-λακταμασών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 174 στελέχη *K.pneumoniae*, 42 στελέχη *E. coli*, 21 στελέχη *P.mirabilis*, 24 στελέχη *E.aerogenes*, 17 στελέχη *E.cloacae* , 9 στελέχη *S.marcescens* , 9 στελέχη *P. stuartii* και 5 στελέχη *K.oxytoca*. Από αυτά , τα 162 ήταν θετικά για την παραγωγή ESBLs και τα 139 ήταν αρνητικά για την παραγωγή ESBLs (γονοτυπικά επιβεβαιωμένα).

B) 67 κλινικά στελέχη *P.aeruginosa*, που απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς. Απο αυτά , τα 27 ήταν θετικά για την παραγωγή ESBLs και τα υπόλοιπα 40 ήταν αρνητικά για την παραγωγή ESBLs (γονοτυπικά επιβεβαιωμένα).

Τα στελέχη αποθηκεύονταν στους -80°C σε ζωμό brain-heart infusion με 15% γλυκερόλης.

A) εντεροβακτηριακά

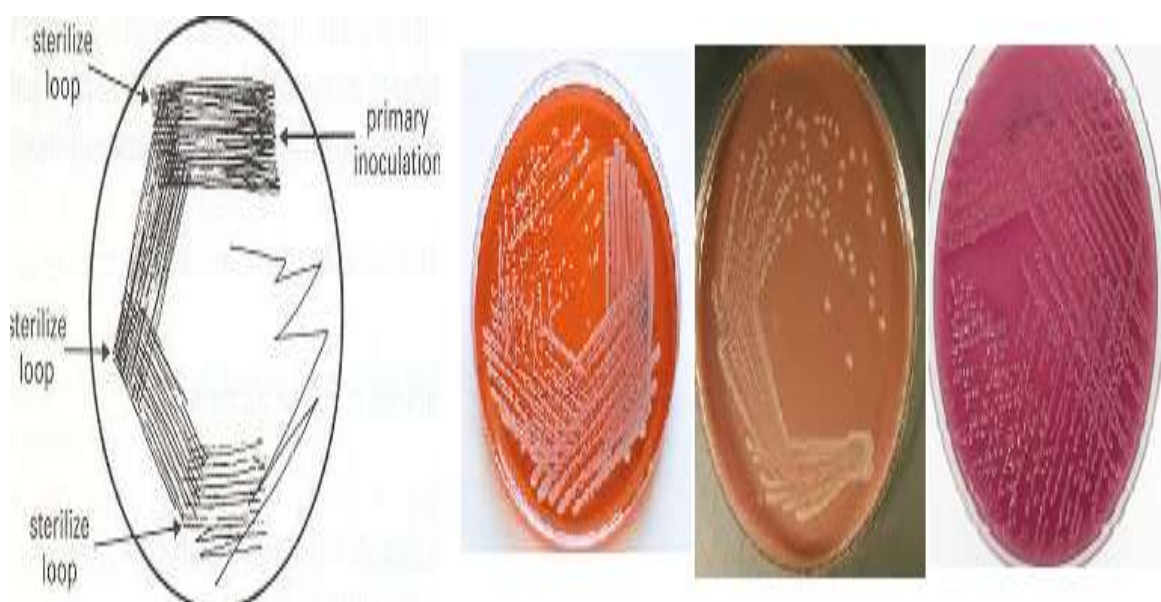
	ESBL-θετικά	ESBL-αρνητικά	
<i>K.pneumoniae</i>	111	63	174
<i>E. coli</i>	26	16	42
<i>E.aerogenes</i>	12	12	24
<i>P.mirabilis</i>	4	17	21
<i>E.cloacae</i>	3	14	17
<i>S.marcescens</i>	0	9	9
<i>P. stuartii</i>	4	5	9
<i>K.oxytoca</i>	2	3	5
σύνολο	162	139	301

B) *P.aeruginosa*

	ESBL-θετικά	ESBL-αρνητικά	
<i>P.aeruginosa</i>	27	40	67

1.2 Καλλιέργεια και απομόνωση

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στα κοινά στερεά θρεπτικά υλικά μετά από επώαση. Ειδικότερα, τα δείγματα ούρων καλλιεργήθηκαν σε υλικό MacConkey και αιματούχο άγαρ και επωάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 18 ώρες. Τα δείγματα αίματος εμβολιάστηκαν σε φιάλες αερόβιων και αναερόβιων αιμοκαλλιεργείων και ακολούθησε επώαση στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα επώασης αιμοκαλλιεργείων Bactec 9120. Οι θετικές αερόβιες φιάλες ανακαλλιεργήθηκαν σε MacConkey, αιματούχο και σοκολατούχο άγαρ και επωάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 18 ώρες.



1.3 Ταυτοποίηση στελεχών της συλλογής

Η ταυτοποίηση των στελεχών βασίστηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, για την ταυτοποίηση των εντεροβακτηριακών χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα API20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), που προσδιορίζει το είδος κάθε βακτηρίου με βάση τις βιοχημικές

του ιδιότητες σύμφωνα με τον αλγόριθμο της κατασκευάστριας εταιρείας. Το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 χρησιμοποιήθηκε ,επίσης , και ως αρχική δοκιμασία διαλογής (screening test) της ευαισθησίας των στελεχών σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ακολούθησε ερμηνεία του αντιβιογράμματος και επιλέχθηκαν τα στελέχη που παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην κεφτοαζιμίμη και την κεφτριαξόνη με MIC >1 μg/ml, στην κεφταζιδιμίμη με MIC >4 μg/ml και την αζτρεονάμη με MIC >4 μg/ml όπως και αυτά που είχαν MIC >2 μg/ml στην κεφεπίμη, MIC >2 μg/ml στην ερταπενέμη, μεροπενέμη και ιμιπενέμη ,σύμφωνα και με τις πρόσφατα αναθεωρημένες οδηγίες του CLSI [389,390].



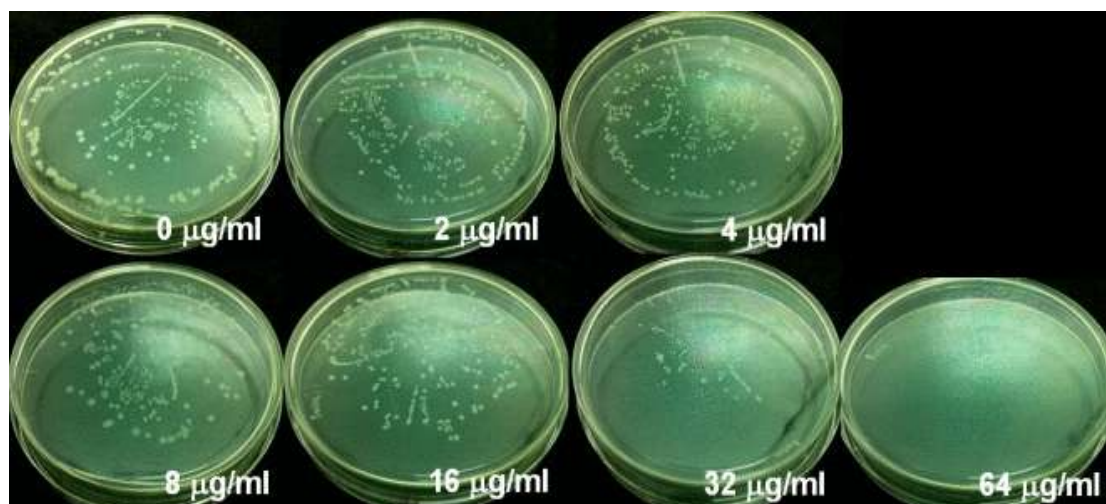
1.4 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά – προσδιορισμός της MIC

Η MIC (Minimum Inhibitory Concentration) είναι η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιβιοτικού, δηλαδή η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την *in vitro* ανάπτυξη του βακτηρίου. Στην παρούσα μελέτη έγινε προσδιορισμός των MICs για τα σημαντικότερα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων σε άγαρ, που θεωρείται μέθοδος αναφοράς.

Ειδικότερα, έγινε προσδιορισμός της MIC έναντι των καρβαπενεμών (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη), των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος (κεφτα-

ζιδίμη, κεφοταξίμη, κεφεπίμη) , του συνδυασμού πιπερακιλλίνης-ταζοβακτάμης, της αζτρεονάμης και της κεφοξιτίνης.

Κάθε διάλυμα αντιβιοτικού παρασκευάστηκε με προτυποποιημένη καθαρή σκόνη αντιβιοτικού. Παρασκευάστηκαν τρυβλία με άγαρ Mueller Hinton (Biolife), που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών από 0,25 mg/ml ως 512 mg/ml. Συγκεκριμένα , οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 και 512 mg/ml. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν βασιζόμενοι στα αποτελέσματα από τον αρχικό προσδιορισμό της MIC με το αυτοματοποιημένο σύστημα. Κάθε βακτηριακό εναιώρημα παρασκευάστηκε με προσθήκη υλικού από πρόσφατη καλλιέργεια 18-24h σε Mueller Hinton (MH), σε φυσιολογικό ορό επιτυγχάνοντας θολερότητα 0,5 της πρότυπης κλίμακας McFarland, η οποία αντιστοιχεί σε περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Στα τρυβλία MH που έχουν ενσωματωμένο το αντιβιοτικό ενοφθαλμίστηκαν 10μl από αραιώση 1:100 του αρχικού εναιωρήματος (περιείχαν περίπου 10^4 - 10^5 αποικίες ανα βακτηριακό στέλεχος). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 18 ώρες και ως MIC καθορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεψε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ως MIC₅₀ και MIC₉₀ ορίζονται οι ελάχιστες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του 50% και 90% αντίστοιχα των υπό εξέταση στελεχών. Ως στελέχη ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *E. coli* ATCC25922 (στέλεχος που δεν παράγει ESBL) και *K.pneumoniae* ATCC 700603 (στέλεχος που παράγει ESBL). Τα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά με βάση τα αναθεωρημένα κριτήρια του CLSI (2010).



1.5 Γονοτυπικός έλεγχος – Μοριακή τυποποίηση των στελεχών

Τα εξεταζόμενα στελέχη ελέχθησαν για γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Συγκεκριμένα, εκτελέστηκαν PCRs μονού τελικού σημείου (single-end) για τα γονίδια που κωδικοποιούν ESBLs (CTX-M, SHV, TEM και GES/IBC), για τα γονίδια των καρβαπενεμασών (VIM,KPC,SME,NDM-1,IMP και OXA-48) και για τα πλασμιδιακά γονίδια AmpC-β-λακταμασών (κυρίως CMY,DHA). Για τα στελέχη *E.colosae*, *E.aerogenes* και *P.aeruginosa* με αποκαταστολή της παραγωγής των AmpCs (derepressed AmpC-producing) χρησιμοποιήθηκε real-time PCR με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR green (Quanti Test SYBR green, Qiagen, Hilden, Germany). Στις PCRs χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές, των οποίων οι αλληλουχίες παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

1.5.1 εξαγωγή του βακτηριακού DNA

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα βακτηριακά σώματα έγινε με τη χρήση του Qiampr DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) χρησιμοποιώντας μεμονωμένες αποικίες από ανακαλλιέργεια που έγινε σε Mueller Hinton άγαρ (MH) για κάθε στέλεχος. Η διαδικασία έχει ως εξής: Δύο ως τρεις μεμονωμένες αποικίες ενοφθαλμίζονται σε 180ml λυτικού διαλύματος ATL Buffer με ανάδευση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 20 μl πρωτεϊνάσης K, γίνεται ανάδευση και επώαση στους 56 °C για 2 ώρες. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων. Μετά την επώαση, προστίθενται 200 μl λυτικού διαλύματος ώστε να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες και ακολουθεί επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια στο υλικό λύσης προστίθενται 200 μl απόλυτης αιθανόλης και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση για 15 λεπτά. Το ομογενοποιημένο δείγμα μεταφέρεται στην ειδική στήλη εκχύλισης που περιέχεται στο kit (Qiampr Spin Column) , που έχει τοποθετηθεί σε ένα σωληνάριο των 2 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1 λεπτό. Η στήλη εκχύλισης μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθεται διάλυμα πλύσεως (500 ml AW1 και 500 ml AW2) και φυγοκεντρείται στις 8000rpm για 1 λεπτό, στις 13000rpm για 3 λεπτά και στις 14000rpm για 1 λεπτό. Τέλος, στη στήλη

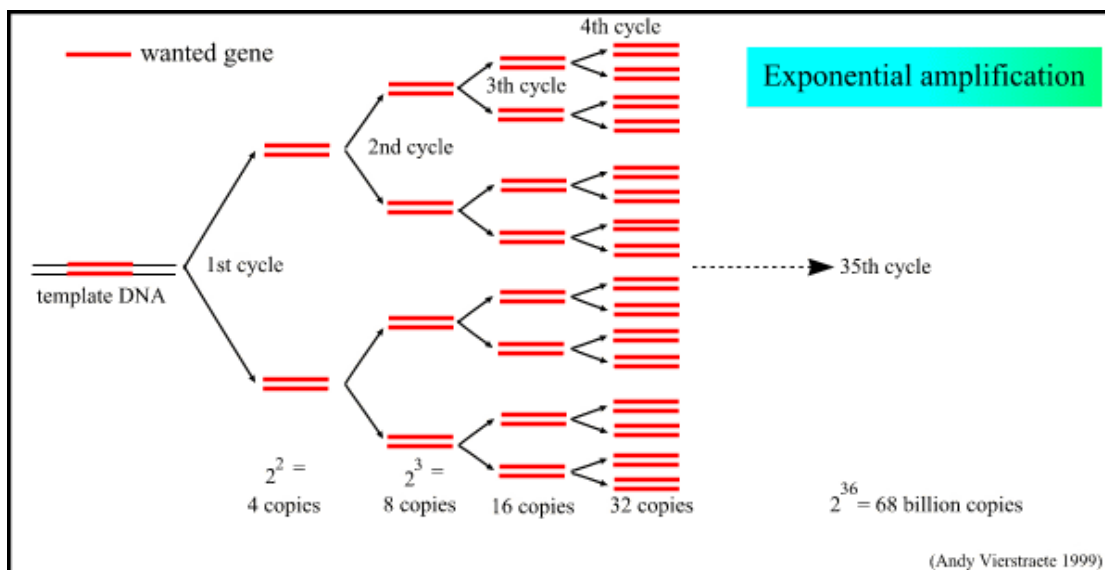
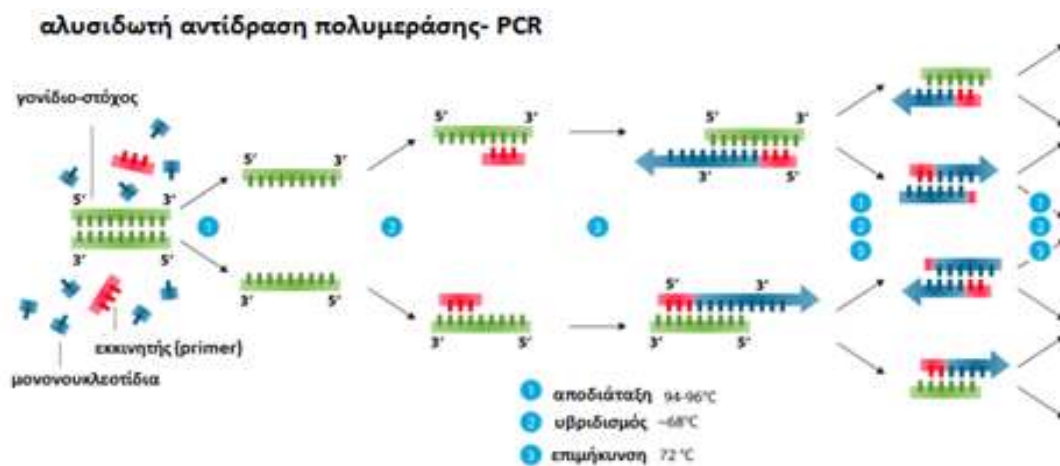
προστίθενται 200 ml διαλύματος εκχύλισης (AE Buffer) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 8000rpm για 1 λεπτό. Το κεκαθαρμένο DNA μπορεί άμεσα να χρησιμοποιηθεί για PCR, ειδάλως αποθηκεύεται σε σωληνάρια erpendorf στους -20°C .



1.5.2 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια μοριακή τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται εντός λίγων ωρών ο πολλαπλασιασμός ελάχιστης ποσότητας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA από μια δεξαμενή διαφόρων ετερογενών μορίων γενετικού υλικού. Με την PCR εντοπίζονται και πολλαπλασιάζονται μόνο τα γονίδια που στοχεύουμε (gene targets) . Επινοήθηκε το 1983 από τον Dr Kary Millis, ο οποίος τιμήθηκε με βραβείο Nobel χημείας το 1993. Είναι από τις πιο διαδεδομένες μοριακές τεχνικές ,χρυσό πρότυπο (gold standard) στη διάγνωση λοιμώξεων και στον εντοπισμό γονιδίων μικροβιακής αντοχής. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρειάζεται 2 συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers), μεγέθους περίπου 20-30 βάσεων, που εντοπίζουν και περικλείουν το γονίδιο-στόχο και μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση , που καταλύει τον πολυμερισμό. Οι εκκινητές (forward και reverse) είναι συμπληρωματικοί ως προς τα άκρα 5' και 3' αντίστοιχα του τμήματος DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η PCR πραγματοποιείται στον κυκλοποιητή , που έχει τη δυνατότητα να εναλλάσσει θερμοκρασίες ανά σύντομα χρονικά διαστήματα. Η αντίδραση ξεκινά με την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (95°C). Ακολουθεί ο υβριδισμός σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ($50-62^{\circ}\text{C}$), οπότε οι εκκινητές συνδέονται στις συγκεκριμένες θέσεις. Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση σε θερμοκρασία συνήθως 72°C παρουσία Mg καταλύει την παραγωγή νέων αλυσίδων με τη χρήση των μονονουκλεοτιδίων , που

περιέχονται στο μίγμα της αντίδρασης. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα προϊόντα του προηγούμενου. Η κυκλική επανάληψη 20-35 φορές των 3 αυτών αντιδράσεων (αποδιάταξη-υβριδισμός-επιμήκυνση) οδηγεί στη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου. Το τελικό προϊόν πρέπει να ανιχνευθεί είτε με ηλεκτροφόρηση είτε με περιοριστικά ένζυμα (RFLP) είτε με υβριδισμό σε μικροπλάκες, μεμβράνες ή μικροσυστοιχίες. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος γίνεται με αλληλούχιση. Εξέλιξη της μεθόδου αποτελεί η πραγματικού χρόνου PCR (real-time PCR), η οποία είναι ταχύτερη και παρέχει δυνατότητα ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης, καθώς καταγράφει συνεχώς την κινητική της αντίδρασης, δεν απαιτεί ηλεκτροφορητική ανάλυση του τελικού προϊόντος, πολλές φορές ούτε και αλληλούχιση .



Στην παρούσα διατριβή, για την ανίχνευση των γονιδίων των ESBLs, των καρβαπενεμασών και των πλασμιδιακών AmpCs, εφαρμόστηκαν PCRs μονού τελικού σημείου (single-end PCRs), και το τελικό προϊόν ανιχνεύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε σε στελέχη *E. Cloacae*, *E.aerogenes* και *P.aeruginosa* με αποκαταστολή της παραγωγής των AmpCs (Quanti Test SYBR green, Qiagen, Hilden, Germany). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με DNA πολυμεράση υψηλής πιστότητας (Ampliqon Taq DNA Polymerase), ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων κατά την ενίσχυση του γονιδίου-στόχου. Η κάθε αντίδραση εκτελείται σε ένα σωληνάριο erpendorf που περιέχει διάλυμα Master Mix Kappa , κατάλληλο για τη δράση της Taq πολυμεράσης, τελικού όγκου 50 μl, που αποτελείται από 2μl εκχυλισμένου DNA , 5μl του ρυθμιστικού διαλύματος , 2μl από κάθε εκκινητή (F και R primer), 2μl μίγματος τριφωσφορικών δεσοξυ-νουκλεοτιδίων dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 36.8 μl απεσταγμένου ύδατος (dH₂O) και 0.2μl της Taq πολυμεράσης. Η PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler στις συνθήκες που αναφέρονται στους πίνακες. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 35 κύκλους με αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά. Σε κάθε αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας για τον κίνδυνο επιμολύνσεων (το erpendorf περιείχε 2μl dH₂O αντι εκχυλισμένου DNA) και θετικός μάρτυρας –control (στο erpendorf προστέθηκε 2μl εκχυλισμένου DNA από γνωστό ως προς την παραγωγή β-λακταμάσης στελέχους από τις συλλογές μικροβίων που διαθέτει το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Ένας θετικός μάρτυρας για κάθε τύπο εξεταζόμενης β-λακταμάσης).



πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων ESBL

γονίδιο	εκκινητής	αλληλουχία (5'-3')	μέγεθος (bp)	Συνθήκες PCR
bla _{CTX-M}	CTX-M -F	GGTTAAAAAATCACTGCG	873	94 ⁰ C 45 sec
	CTX-M-R	TTACAAACCGTCGGA		54 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{SHV}	SHV A	ACTGAATGAGGCGCTTCC	220	94 ⁰ C 1 min
	SHV B	CGCACCCCGCTTGCT		54 ⁰ C 1 min 72 ⁰ C 1 min
bla _{SHV}	SHV -F	GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGCT	1014	94 ⁰ C 45 sec
	SHV -R	TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA		54 ⁰ C 1 min 72 ⁰ C 1 min
bla _{TEM}	TEM A	TCAGAAGTAAGTTGGC	335	94 ⁰ C 1 min
	TEM S	CCTGTTTTTGCTCACCC		54 ⁰ C 1 min 72 ⁰ C 1 min
bla _{TEM}	TEM- F	TTCTTGAAGACGAAAGGGC	1208	94 ⁰ C 45 sec
	TEM- R	ACGCTCAGTGGAACGAAAAC		54 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{GES/IBC}	GES-1 F	CCCCAAGGAGAGATCGTCG	618	95 ⁰ C 45 sec
	GES-1 R	GTAATCCTCTCTCCTGGGCTT		53 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{PER}	PER- F	GCCTGACGATCTGGAACCTT	587	95 ⁰ C 45 sec
	PER-R	GCCGTCCATCAGGCAACA		53 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min

πίνακας 3: εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων καρβαπενεμασών

γονίδιο	εκκινητής	αλληλουχία (5'-3')	μέγεθος (bp)	Συνθήκες PCR
bla _{VIM}	VIMN -F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC	509	94 ⁰ C 45 sec
	VIMN-R	TGGGCCATTCAGCCAGATC		53 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{VIM}	VIM1-F	TTATGGAGCAGCAACGATGT	920	95 ⁰ C 45 sec
	VIM1-R	CAAAAGTCCCCTCCAACGA		53 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{IMP}	IMP -F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	587	95 ⁰ C 1 min
	IMP -R	AACCAGTTTTGCCTTACCAT		53 ⁰ C 1 min 72 ⁰ C 90 sec
bla _{KPC}	KPC A	GTAATCTCTCTCCTGGGCTT	780	95 ⁰ C 45 sec
	KPC B	TACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC		53 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{KPC}	KPC- F	GCTACACCTAGCTCCACCTTC	989	94 ⁰ C 45 sec
	KPC- R	GCATGGATTACCAACCACTGT		54 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
Bla _{OXA-48}	OXA-48 A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	725	95 ⁰ C 45 sec
	OXA-48 B	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		54 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min
bla _{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	95 ⁰ C 45 sec
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		54 ⁰ C 45 sec 72 ⁰ C 1 min

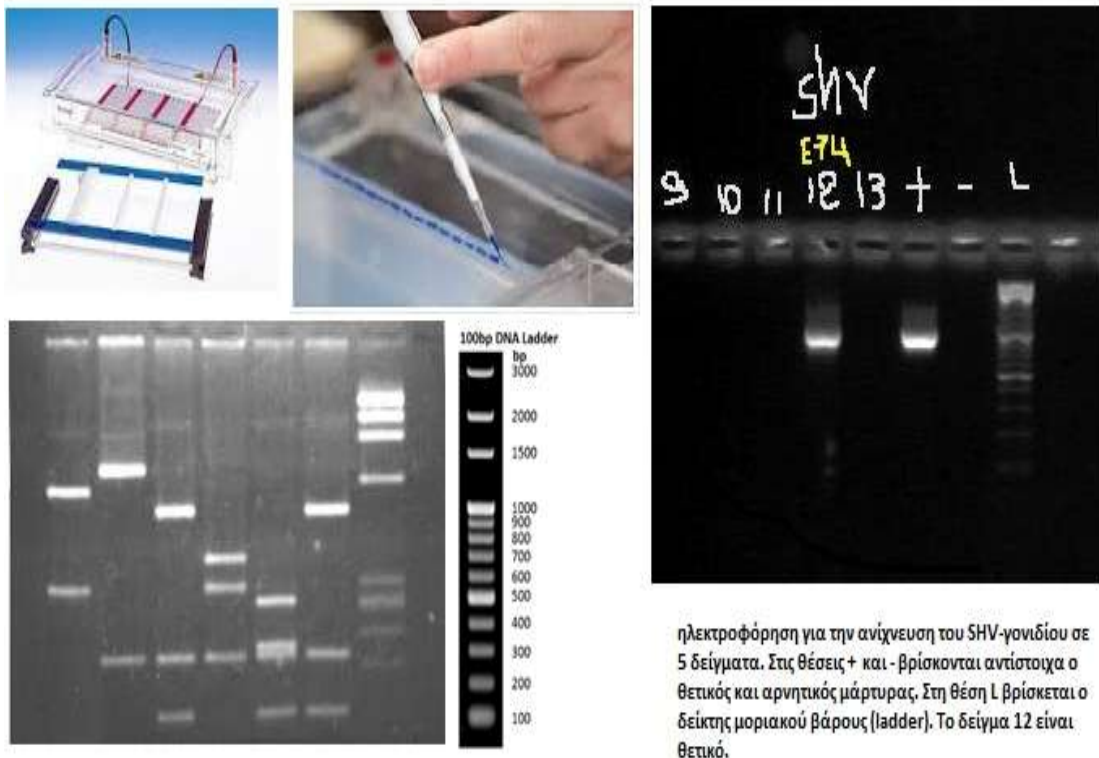
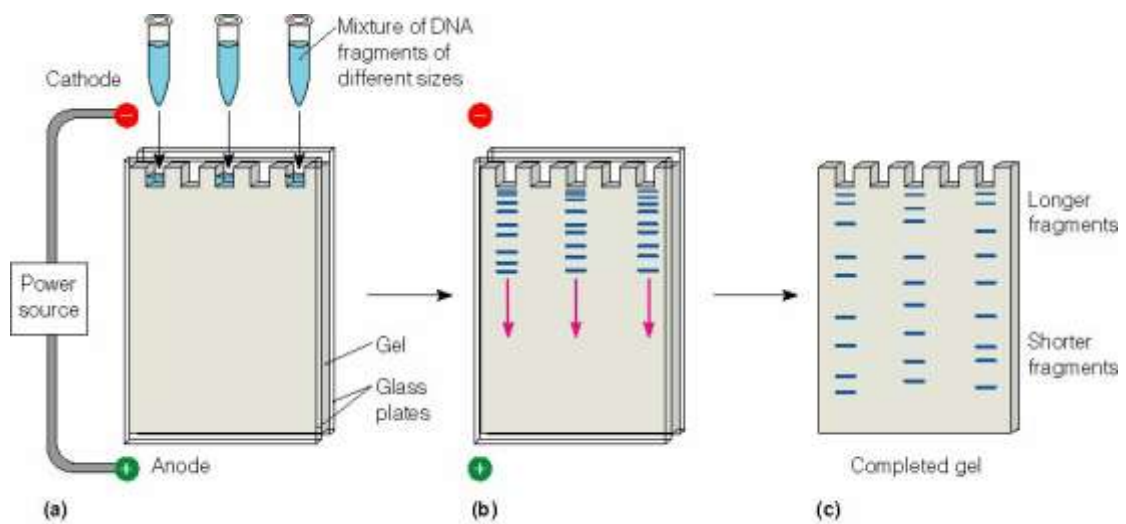
πίνακας 4: εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων πλασμιδιακών AmpC β-λακταμασών

γονίδιο	εκκινητής	αλληλουχία (5'-3')	μέγεθος (bp)	Συνθήκες PCR
MOX-1,MOX-2	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	94 ⁰ C 30 sec
CMY-1,CMY-8 ως -11	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min
LAT-1,LAT-4	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	94 ⁰ C 30 sec
CMY-2 ως -7	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min
DHA-1 ,DHA-2	DHAMF	AACTTTCACAGGTGCTGGT	405	94 ⁰ C 30 sec
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min
ACC	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	94 ⁰ C 30 sec
	KPC B	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min
MIR1T ,ACT-1	EBCM- F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	94 ⁰ C 30 sec
	EBCM- R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min
FOX 1 ως	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	94 ⁰ C 30 sec
FOX-5b	FOXMR	CAAAGCGCTAACCGGATTGG		64 ⁰ C 30 sec 72 ⁰ C 1 min

1.5.3 ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε γέλη αγαρόζης

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Το πήκτωμα παρασκευάζεται ως εξής: Σε 200ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x διαλύονται 4 gr αγαρόζης σε σκόνη (Invitrogen ,USA) με θέρμανση για 2-3 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων. Το διάλυμα ψύχεται ελαφρώς και προστίθεται σ' αυτό 15μl βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (SCHARLAU Chemie SA,Barcelona). Το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο είναι τοξικό αντιδραστήριο, είναι φθορίζουσα χρωστική που προστίθεται για να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το μίγμα αναδεύεται καλά και στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης , στην οποία έχει τοποθετηθεί κατάλληλη «χτένα» προκειμένου να δημιουργηθούν οι θέσεις , τα «πηγαδάκια» , στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα. Το πήκτωμα στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν βυθίζεται στη δεξαμενή της συσκευής , στην οποία υπάρχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Το ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x παρασκευάζεται από 54gr Tris, 27.5 gr βορικού οξέος, 20ml EDTA 0,5M pH 8 και ποσότητα dH₂O μέχρι τελικού όγκου 1 lt. Ποσότητα 10μl από κάθε προϊόν PCR αναμεμιγμένο με 2μl χρωστικής 6x (6x Loading Dye Solution,Fermentas , Canada) μεταφέρεται σε μία από τις θέσεις υποδοχής (πηγαδάκια) της πήκτης. Η χρωστική μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την ηλεκτροφόρηση. Στην πρώτη θέση υποδοχής τοποθετείται δείκτης μοριακού βάρους , μια κλίμακα μορίων DNA (100bp DNA ladder ,Fermentas, Canada) που περιέχει τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους και μας επιτρέπει να συγκρίνουμε το μοριακό βάρος του εξεταζόμενου δείγματος. Σε άλλες δυο θέσεις τοποθετούμε και το θετικό και αρνητικό μάρτυρα, που μας επιτρέπει να διαπιστώσουμε αντίστοιχα, την παρουσία του εξεταζόμενου γονιδίου και τυχόν επιμολύνσεις . Η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε οριζόντια συσκευή , σε σταθερή τάση 200 V για περίπου 30min. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, τα μόρια DNA ,τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, διαχωρίζονται αναλόγως του μεγέθους τους καθώς κινούνται από την άνοδο προς την κάθοδο. Επίσης , στο διαχωρισμό παίζουν ρόλο η ένταση του πεδίου και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Όσα τμήματα έχουν το ίδιο μέγεθος σχηματίζουν μία ενιαία ζώνη.

Η ανάγνωση και η φωτογράφιση των αποτελεσμάτων γίνεται κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η πολλαπλασιασμένη με PCR αλληλουχία, την οποία στοχεύσαμε, παρουσιάζεται σαν μία έντονη ζώνη κάτω από το υπεριώδες φως.



ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση του SHV-γονιδίου σε 5 δείγματα. Στις θέσεις + και - βρίσκονται αντίστοιχα ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Στη θέση L βρίσκεται ο δείκτης μοριακού βάρους (ladder). Το δείγμα 12 είναι θετικό.

Ανίχνευση των προϊόντων της single-end PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

1.5.4 καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχιση.

Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση. Εφαρμόστηκε καθαρισμός για την απομάκρυνση αλάτων, εκκινητών, μονουκλεοτιδίων και άλλων αντιδραστηρίων με το σύστημα ExoSAP-IT (USB Corporation, OH, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το αντιδραστήριο ExoSAP-IT χρησιμοποιεί δύο υδρολυτικά ένζυμα, την εξωνουκλεάση I και τη SAP σε ειδικά σχεδιασμένα ρυθμιστικό διάλυμα. Η εξωνουκλεάση I απομακρύνει τους εκκινητές και κάθε εξωγενές μονόκλωνο DNA που παράγεται κατά τη PCR. Η SAP αφαιρεί τα υπόλοιπα dNTPs από το μίγμα PCR. Συγκεκριμένα, 5 μl του προϊόντος PCR αναμιγνύονται με 2 μl του αντιδραστηρίου και το μίγμα των 7 μl επωάζεται στους 37°C για 15 min, οπότε γίνεται η διαδικασία της απομάκρυνσης, και τέλος, γίνεται επώαση για άλλα 15 min στους 80°C για να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα του αντιδραστηρίου. Τα προϊόντα της PCR είναι τότε έτοιμα για άμεση αλληλούχιση, ειδάλλως αποθηκεύονται στους -20°C.

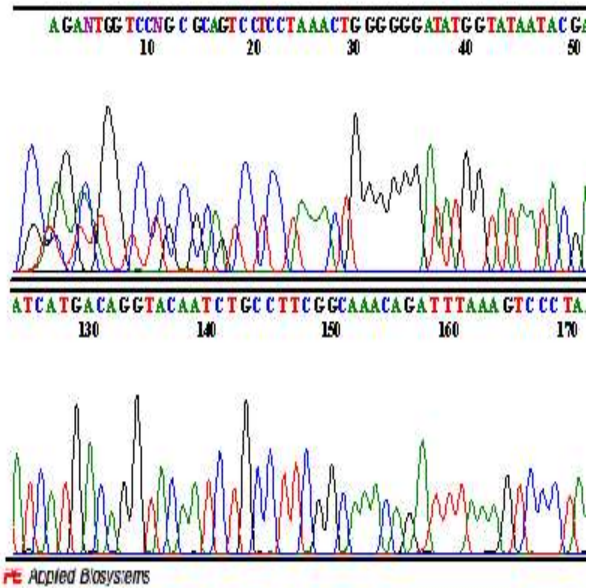
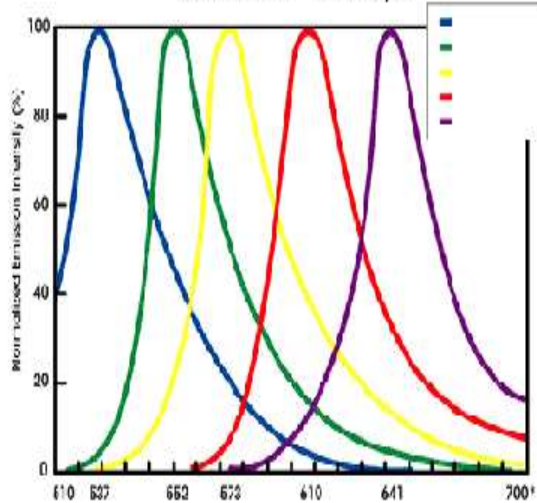
Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα ABI Prism 377 (Applied Biosystems Division, Foster City, CA), που βασίζεται στην αρχή της μεθόδου Sanger. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται σημασμένα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) 4 διαφορετικών χρωστικών, μία για κάθε βάση. Τα ddNTPs στερούνται της 3-OH ομάδας και μπορούν να ενσωματώνονται στη νουκλεοτιδική αλληλουχία εμποδίζοντας την προσθήκη άλλων νουκλεοτιδίων. Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκυκλοποιητή και χρησιμοποιείται ένας εκκινητής, που οδηγεί σε γραμμικό πολλαπλασιασμό των προϊόντων επέκτασης. Για κάθε δείγμα, γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις σε 4 ξεχωριστά σωληνάρια, που το καθένα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια, το σημασμένο ddNTP και τον εκκινητή, οπότε προκύπτουν 4 σημασμένα DNA θραύσματα. Οι αλληλουχίες αυτές DNA που προκύπτουν ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια, η ανάλυση του ηλεκτροφορήματος γίνεται με αυτόματο αναλυτή αλληλούχισης και αποτυπώνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος.

Οι αλληλουχίες βάσεων που ανευρέθηκαν, συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών GenBank, που διατίθεται από το NCBI (National Center for Biological Information).



GeneScan Dyes

ABI PRISM 377 DNA Analyzer



Αλληλούχιση με το σύστημα *ABI Prism 377*. Χρησιμοποιώντας 4 σημασμένες χρωστικές, η καθεμία ειδική για κάθε βάση, προκύπτει τελικώς ένα χρωματογράφημα, που καθρεφτίζει την αλληλουχία των DNA θραυσμάτων. Οι αλληλουχίες DNA συγκρίνονται με τις αλληλουχίες της *GenBank*.

1.6 Φαινοτυπικές δοκιμασίες

1.6.1 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή ESBLs

Μετά το πρώτο βήμα της διαλογής ευαισθησίας των στελεχών και του προσδιορισμού της MIC (με το αυτοματοποιημένο σύστημα και με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων στο άγαρ), ακολουθεί το δεύτερο βήμα της φαινοτυπικής επιβεβαίωσης.

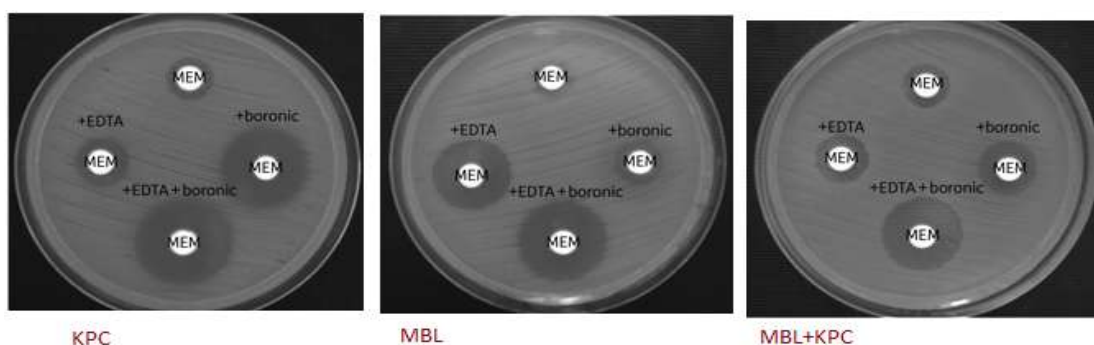
Για το βήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε η προτεινόμενη από το CLSI δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (ESBL phenotypic confirmatory test). Σύμφωνα με τις οδηγίες, δίσκοι κεφταξίμης 30μg (CTX) και κεφταζιδίμης 30 μg (CAZ), χωρίς και σε συνδυασμό με κλαβουλανικό οξύ 10 μg (CA) (Becton, Dickinson, Sparks, MD) τοποθετούνται στην επιφάνεια Mueller Hinton, που ενοφθαλμίστηκε με εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου θολερότητας 0,5McFarland και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 18 ώρες.

Αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από το συνδυασμένο δίσκο ίση ή μεγαλύτερη των 5mm σε σύγκριση με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής της κεφαλοσπορίνης χωρίς κλαβουλανικό είναι ενδεικτική της παραγωγής ESBLs. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *E. coli* ATCC25922 (στέλεχος που δεν παράγει ESBL) και *K.pneumoniae* ATCC 700603 (στέλεχος που παράγει ESBL)[378].



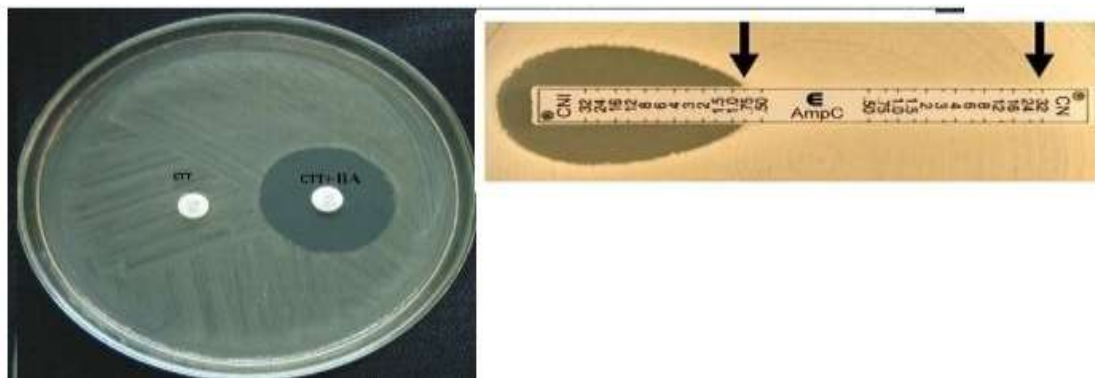
1.6.2 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή και διαφοροποίηση MBL,KPC

Ο φαινοτυπικός έλεγχος παραγωγής MBL,KPC ή σύγχρονης παραγωγής MBL και KPC έγινε στα στελέχη που εμφάνισαν μειωμένη ευαισθησία σε μία τουλάχιστον καρβαπενέμη (όπως μεροπενέμη MIC >1 µg/ml και διάμετρος ζώνης αναστολής <25mm). Χρησιμοποιήθηκαν 4 δίσκοι αντιβιοτικών ανά τρυβλίο: δίσκος μεροπενέμης 10 µg , δίσκος μεροπενέμης 10 µg στον οποίο προστέθηκε 10µl διαλύματος 0,1M EDTA (που περιέχει 292µg EDTA) , δίσκος μεροπενέμης 10 µg στον οποίο προστέθηκε 10µl φαινυλβορονικού οξέος 40mg/ml (που περιέχει 400µg PBA) και τέλος, δίσκος μεροπενέμης 10 µg στον οποίο προστίθενται 292µg EDTA και 400µg PBA μαζί . Τα δισκία τοποθετούνται στην επιφάνεια Mueller Hinton , που ενοφθαλμίστηκε με εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου θολερότητας 0,5McFarland και ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για 18 ώρες [386]. Αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης που περιέχει PBA , καθώς και γύρω από το δίσκο στον οποίο έχουν προστεθεί και τα δύο αντιδραστήρια κατά >5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της μόνης μεροπενέμης θεωρείται θετική για την παραγωγή KPC. Διεύρυνση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης που περιέχει EDTA, καθώς και γύρω από το δίσκο στον οποίο έχουν προστεθεί και τα δύο αντιδραστήρια, κατά >5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της μόνης μεροπενέμης θεωρείται θετική για την παραγωγή MBL. Αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης που περιέχει τα δύο αντιδραστήρια , κατά >5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της μόνης μεροπενέμης και συγχρόνως διεύρυνση < 5mm σε κάθε δίσκο που περιέχει μόνο το ένα αντιδραστήριο , θεωρείται θετική για την ταυτόχρονη παραγωγή MBL και KPC.



1.6.3 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή AmpC-β- λακταμασών

Για το φαινοτυπικό έλεγχο παραγωγής των AmpC-β- λακταμασών από τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη (MIC > 8 µg/ml) χρησιμοποιήθηκαν δίσκος κεφοτετάνης 30 µg (CTT) χωρίς ή με προσθήκη 400µg φαινυλβορονικού (PBA) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής κατά >5mm γύρω από το δίσκο του συνδυασμού συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο της μόνης κεφοτετάνης υποδηλοί την παρουσία AmpCs. Επίσης, ο έλεγχος έγινε και με ταινίες E-test (bioMerieux), που περιέχουν κεφοτετάνη σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις με ή χωρίς κλοξακιλλίνη. Γίνεται επώαση στους 37°C για 18 ώρες . Το τεστ θεωρείται θετικό όταν υπάρχει τριπλάσια ή μεγαλύτερη μείωση της MIC της κεφοτετάνης παρουσία της κλοξακιλλίνης [435].



1.6.4 φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή ESBLs με το τροποποιημένο τεστ

Η τροποποιημένη μέθοδος (modified CLSI ESBL test) χαρακτηρίζεται από την προσθήκη φαινυλβορονικού οξέος (PBA) και EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών κεφοταξίμης και κεφταζιδίμης απουσία ή παρουσία κλαβουλανικού οξέος.

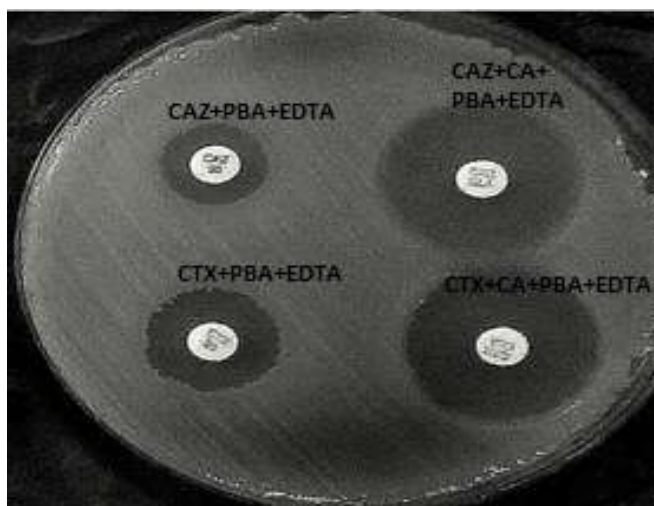
Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι:

- i) παρασκευάστηκε για το κάθε στέλεχος ξεχωριστά εναιώρημα θολρότητας 0,5 McFarland
- ii) έγινε ενοφθαλμισμός σε Mueller-Hinton άγαρ
- iii) τοποθετήθηκαν δίσκοι κεφοταξίμης (CTX, 30µg) και κεφταζιδίμης (CAZ, 30 µg) χωρίς ή με κλαβουλανικό οξύ (CA, 10 µg). Συνολικά υπήρχαν 4 δίσκοι αντιβιοτικών

ανά τρυβλίο και προσετέθησαν 400mg PBA και 292mg EDTA σε καθέναν από τους 4 δίσκους αντιβιοτικών. Το φαινυλβορονικό οξύ (PBA) είναι αναστρέψιμος αναστολέας των KPC καρβαπενεμασών και των AmpC-β- λακταμασών Το EDTA είναι χηλικός υποκαταστάτης που αναστέλλει τις μέταλλο-β-λακταμάσες δεσμεύοντας τα ιόντα ψευδαργύρου που είναι απαραίτητα για τη δράση τους [381-386,435,444-446]. Το διάλυμα PBA παρασκευάστηκε με διάλυση 0,240gr βορονικού (Sigma - Aldrich, Stenheim, Germany) σε 3ml διαλύτη DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) και στη συνέχεια προστέθηκαν 3ml dH₂O, οπότε προκύπτει διάλυμα 40mg/ml. Από αυτό, λαμβάνονται 10μl (που περιέχει 400 μg PBA) και μεταφέρεται στους δίσκους αντιβιοτικών. Το διάλυμα EDTA παρασκευάστηκε με διάλυση 1ml άνυδρου EDTA (Sigma -Aldrich) σε 4 ml απεσταγμένου νερού, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 0,1M. Από αυτό, λαμβάνονται 10μl (που περιέχει 292μg EDTA) και μεταφέρεται στους δίσκους αντιβιοτικών.

iv) τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37^o C για 18 ώρες.

v) κατόπιν μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από κάθε δίσκο αντιβιοτικού. Το τροποποιημένο τεστ θεωρήθηκε θετικό ως προς την παραγωγή ESBLs, όταν παρατηρήθηκε αύξηση μεγαλύτερη ή ίση των 5mm της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο CTX-CA ή CAZ-CA, όπου είχαν επιπλέον προστεθεί PBA και EDTA συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο CTX ή CAZ, παρουσία PBA και EDTA, στον οποίο δεν υπήρχε το κλαβουλανικό οξύ. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις PBA και EDTA που εφαρμόστηκαν στο τροποποιημένο τεστ δεν είχαν κάποια επίδραση στη βακτηριακή ανάπτυξη.



1.7 Προσδιορισμός ευαισθησίας ,ειδικότητας, θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας

Η απόδοση των συγκρινόμενων φαινοτυπικών δοκιμασιών ,του CLSI-ESBL confirmatory test και του τροποποιημένου τεστ (modified CLSI-ESBL confirmatory test) αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την PCR και την νουκλεοτιδική αλληλούχιση ως πρότυπο μέθοδο (χρυσό πρότυπο,gold standard). Για την αξιολόγηση της ευαισθησίας των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν 189 γονοτυπικά επιβεβαιωμένα στελέχη για την παραγωγή ESBLs . Για την αξιολόγηση της ειδικότητας των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν 179 στελέχη με αρνητική PCR για γονίδια των ESBLs. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία κάθε δοκιμασίας υπολογίστηκε από τον αριθμό των θετικών για ESBLs στελεχών , που προσδιορίστηκαν σωστά , ενώ η ειδικότητα υπολογίστηκε από τον αριθμό των αρνητικών για ESBLs στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

$$\text{ευαισθησία (sensitivity)} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100\%$$

TP : True Positive , αληθώς θετικό
TN: True Negative, αληθώς αρνητικό
FP : False Positive , ψευδώς θετικό
FN: False Negative, ψευδώς αρνητικό

$$\text{ειδικότητα (specificity)} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}} \times 100\%$$

$$\text{θετική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value)} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}} \times 100\%$$

$$\text{αρνητική προγνωστική αξία (Negative Predictive Value)} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FN}} \times 100\%$$

2.Αποτελέσματα

A. Εντεροβακτηριακά

Τα εντεροβακτηριακά είναι μια μεγάλη οικογένεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η οικογένεια αυτή συμπεριλαμβάνει πολλά γένη με εκατοντάδες είδη. Είναι αερόβια ή δυνητικά αναερόβια, μη σπορογόνα. Αποτελούν κύριο συστατικό της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των περισσότερων ζώων , συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα και γιαυτό επιζούν), αλλά μπορούν να αποικίσουν και άλλα μέρη του σώματος. Αποβάλλονται με τα κόπρανα και αποικίζουν το περιβάλλον (έδαφος και νερό). Κάποια είδη είναι πάντοτε παθογόνα για τον άνθρωπο (όπως *Shigella*, *Salmonella* , *Yersinia spp*), ενώ άλλα είδη (όπως *E.coli* , *Klebsiella spp* , *Proteus spp*) μπορούν να προκαλέσουν ευκαιριακές λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε ασθενείς με συννοσηρότητες ή με παρουσία εξωσωματικών συσκευών. Τα εντεροβακτηριακά απομονώνονται πολύ συχνά, συγκεκριμένα μπορεί να αποτελούν ως και το 80% των κλινικά σημαντικών Gram-αρνητικών στελεχών και το 50% των κλινικά σημαντικών βακτηρίων στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Επίσης, θεωρούνται υπεύθυνα για την πλειονότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Συγκεκριμένα, η *E.coli* είναι το συχνότερο αίτιο ενδοноσοκομειακών ουρολοιμώξεων και βακτηριαμιών , ακολουθούμενη από *Klebsiella spp*. Το τρίτο κατά σειρά αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων ουροποιητικού είναι ο *P.mirabilis*. Τα *Klebsiella spp* και *Enterobacter spp* αποτελούν συχνά αίτια νοσοκομειακής πνευμονίας.

Τα τελευταία χρόνια η αντοχή των εντεροβακτηριακών αυξάνεται παγκοσμίως. Η πανδημία της αντοχής των εντεροβακτηριακών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εμφάνιση και τη διάδοση των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBLs). Σύμφωνα με το CDC, τα εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBLs συνιστούν σοβαρή απειλή για τη Δημόσια Υγεία, καθώς ευθύνονται για 26000 νοσοκομειακές λοιμώξεις (HAIs) ετησίως στις ΗΠΑ και οδηγούν σε 1700 θανάτους κατ' έτος . Όσον αφορά στην κοινότητα, μας απασχολεί το *E.coli*, που είναι το συχνότερο αίτιο λοιμώξεων ουροποιητικού. Εμφανίζει αυξανόμενη αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς (3GCs) . Όσον αφορά στις νοσοκομειακές λοιμώξεις, μας απασχολεί

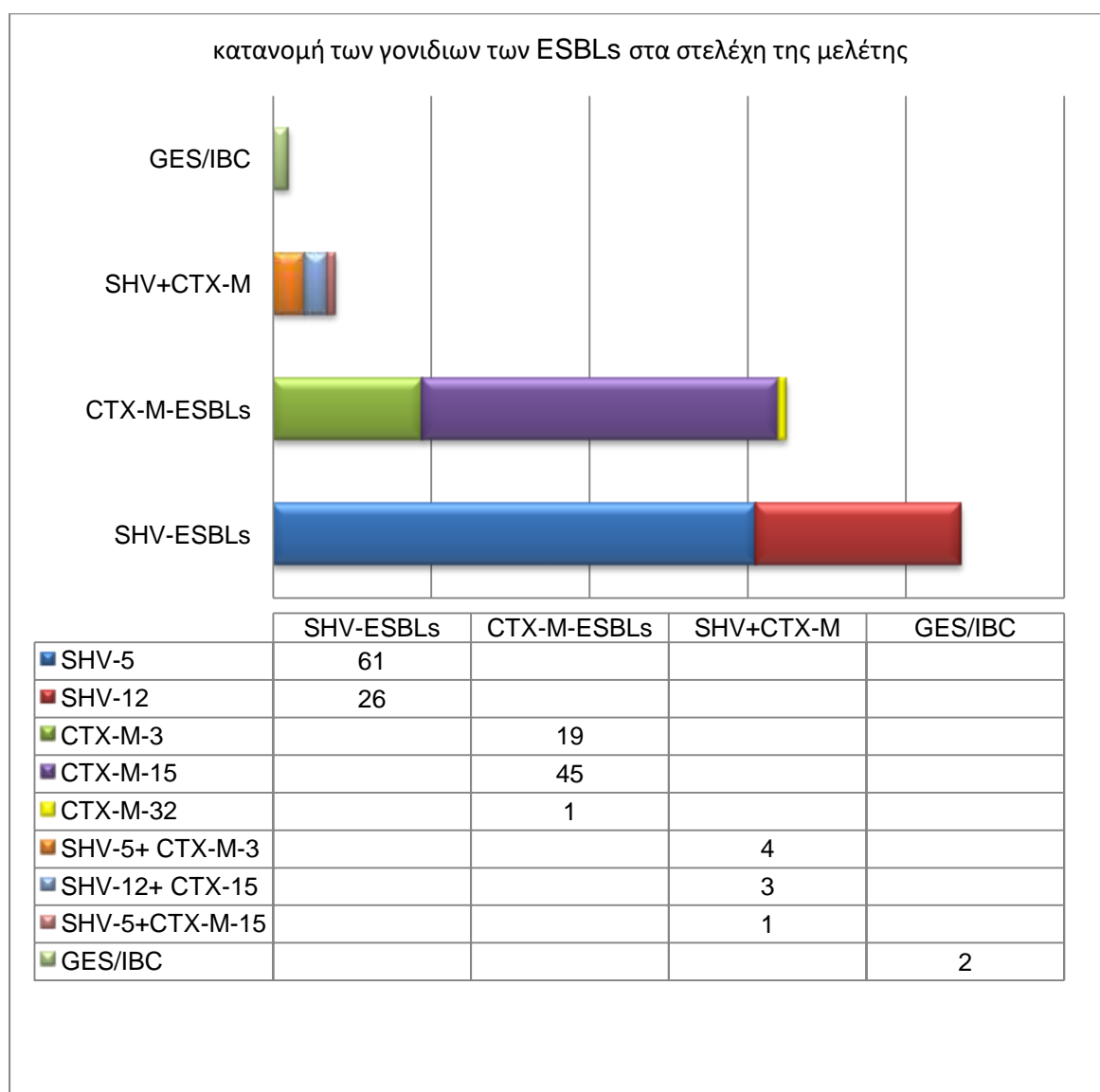
η *K.pneumoniae*. Η *K.pneumoniae* είναι σημαντική από επιδημιολογική άποψη λόγω της ιδιότητάς της να προσλαμβάνει εύκολα νέους μηχανισμούς αντοχής και να τους συσσωρεύει διευκολύνοντας έτσι τη διασπορά αυτών και στα υπόλοιπα εντεροβακτηριακά. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με δεδομένα του ECDC, το 2016 η αντοχή στις 3GCs για το *E.coli* ήταν 17,6% και για την *K.pneumoniae* ήταν 72,5%. Σε ποσοστό 85-90% , η αντοχή αυτή στις 3GCs οφείλεται στην παραγωγή ESBLs. Σε μικρότερο ποσοστό, η αντοχή στις 3GCs οφείλεται στην παραγωγή AmpC-β-λακταμάσης (πλασμιδιακής ή υπερπαραγωγή χρωμοσωμικής). Εντεροβακτηριακά που εκφράζουν AmpCs μπορούν ταυτόχρονα να παράγουν και ESBLs. Στη θεραπευτική άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως οι καρβαπενέμες. Αυτό οδήγησε στην ανάδυση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Πρώτη αναφορά μεταλλο-β-λακταμάσης σε εντεροβακτηριακά αφορούσε σε στέλεχος *S.marcescens* , που παρήγαγε IMP-1 (1991, Ιαπωνία). Πρώτη αναφορά σερινο-καρβαπενεμάσης σε εντεροβακτηριακά αφορούσε σε στέλεχος *K.pneumoniae* , που παρήγαγε την KPC-1 (1996, ΗΠΑ), ενώ OXA-καρβαπενεμάση (OXA-48) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 2001 από στέλεχος *K.pneumoniae*. Πολλά από αυτά τα στελέχη εξακολουθούν να παράγουν παράλληλα και ESBLs. Ολοένα και πληθαίνουν οι περιγραφές στελεχών με πολλαπλά γονίδια β-λακταμασών επιπλέον των ESBLs . Δεν υπάρχουν παγκόσμιες μελέτες για την ακριβή επίπτωση της ταυτόχρονης παραγωγής ESBLs/καρβαπενεμασών και ESBLs/AmpCs. Η κατανομή είναι άνιση και κυμαίνεται ανά περιοχή, ανά βακτηριακό είδος και ανά είδος β-λακταμάσης. Μελέτες περιγράφουν ποσοστά συνύπαρξης 2,2-85% για ESBLs/καρβαπενεμάσες και 5-8,5% για ESBLs/ AmpCs.

Το CLSI από το 2000 συστήνει τη δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (CDT) για την ανίχνευση των ESBLs. Η δοκιμασία αυτή, το CLSI ESBL confirmatory test, δεν εφαρμόζεται σε στελέχη που φέρουν AmpCs ή καρβαπενεμάσες.

Σκοπός του πρώτου μέρους της διατριβής είναι να εφαρμόσουμε το CLSI –ESBL τεστ και το τροποποιημένο (modified CLSI ESBL test) σε στελέχη εντεροβακτηριακών ώστε να τα συγκρίνουμε και να δούμε αν όντως η τροποποίηση με την προσθήκη βορονικού και EDTA βελτιώνει την απόδοση αποκαλύπτοντας την παραγωγή ESBLs όταν ταυτόχρονα παράγονται AmpCs ή καρβαπενεμάσες.

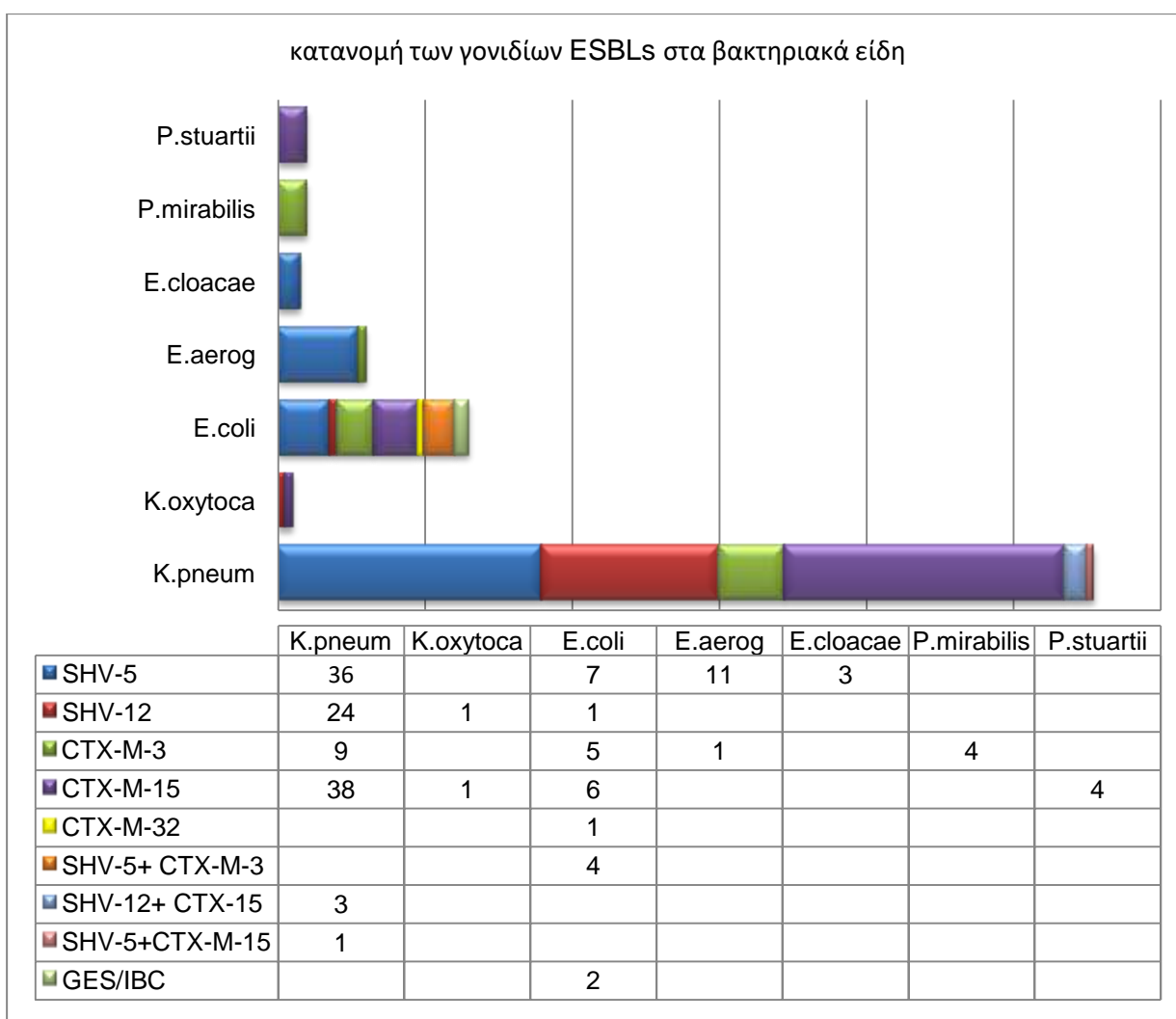
A.1. κατανομή των γονιδίων ESBLs στα εξεταζόμενα κλινικά στελέχη εντεροβακτηριακών

Ο μοριακός έλεγχος με PCR και νουκλεοτιδική αλληλούχιση έδειξε ότι μεταξύ των 162 θετικών για ESBL στελεχών , τα 87 (53,7%) έφεραν SHV τύπο ESBLs (61 SHV-5 και 26 SHV-12), τα 65 (41,1%) έφεραν τον τύπο CTX-M- ESBLs (45 CTX-M-15, 19 CTX-M-3 και 1 CTX-M-32),τα 8 (4,9%) έφεραν συγχρόνως και SHV-ESBL και CTX-M-ESBL (4 SHV-5 και CTX-M-3, 3 SHV-12 και CTX-M-15 , 1 SHV-5 και CTX-M-15) και 2 (1,2%) έφεραν GES-7 ESBL. Επίσης, 104 (64,2%) από τα ESBL-θετικά στελέχη εξέφραζαν την TEM-1 β-λακταμάση.



A.2 κατανομή των γονιδίων ESBLs ανάμεσα στα είδη των εντεροβακτηριακών

Μεταξύ των 111 στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν ESBLs, τα 47 (42,34%) ήταν θετικά για CTX-M- ESBLs ,τα 60 (54,05%) ήταν θετικά για SHV-ESBL και 4 (3,6%) στελέχη εξέφραζαν συγχρόνως CTX-M και SHV-ESBLs. Μεταξύ των 26 θετικών για ESBL στελεχών *E.coli* , τα 12 (46,15%) ήταν θετικά για CTX-M-ESBLs, τα 8 (30,76%) ήταν θετικά για SHV-ESBLs, 4 στελέχη (15,38%) εξέφραζαν ταυτόχρονα CTX-M-ESBLs και SHV-ESBLs και 2 στελέχη (7,69%) έφεραν GES-7. Μεταξύ των 12 ESBL-θετικών *E.aerogenes* , τα 11 (91,67%) εκφράζουν SHV-ESBLs, ενώ 1 (8,33%) παράγει CTX-M (την CTX-M-3). Τα 3 θετικά για ESBL στελέχη *E.cloacae* και τα 4 θετικά για ESBL στελέχη *P.stuartii* παράγουν SHV –ESBLs (τη SHV-5). Τα 4 θετικά για ESBLs στελέχη *P.mirabilis*, εκφράζουν CTX-M-ESBL (την CTX-M-3). Από τα 2 θετικά για ESBL στελέχη *K.oxytoca*, το ένα εκφράζει την CTX-M-15 και το άλλο την SHV-12.



A.3 κατανομή των γονιδίων των άλλων τύπων β-λακταμασών

Από το φαινοτυπικό και γονοτυπικό έλεγχο προέκυψε ότι από τα 301 στελέχη εντεροβακτηριακών της μελέτης, τα 222 (73,75%) παρήγαγαν κι άλλους τύπους ισχυρών β-λακταμασών. Τα 108 από αυτά ήταν στελέχη που ταυτόχρονα παρήγαγαν ESBLs και τα υπόλοιπα 114 ήταν στελέχη που δεν παρήγαγαν ESBLs και παρήγαγαν μόνο αυτούς τους άλλους τύπους ισχυρών β-λακταμασών. Αναλυτικότερα:

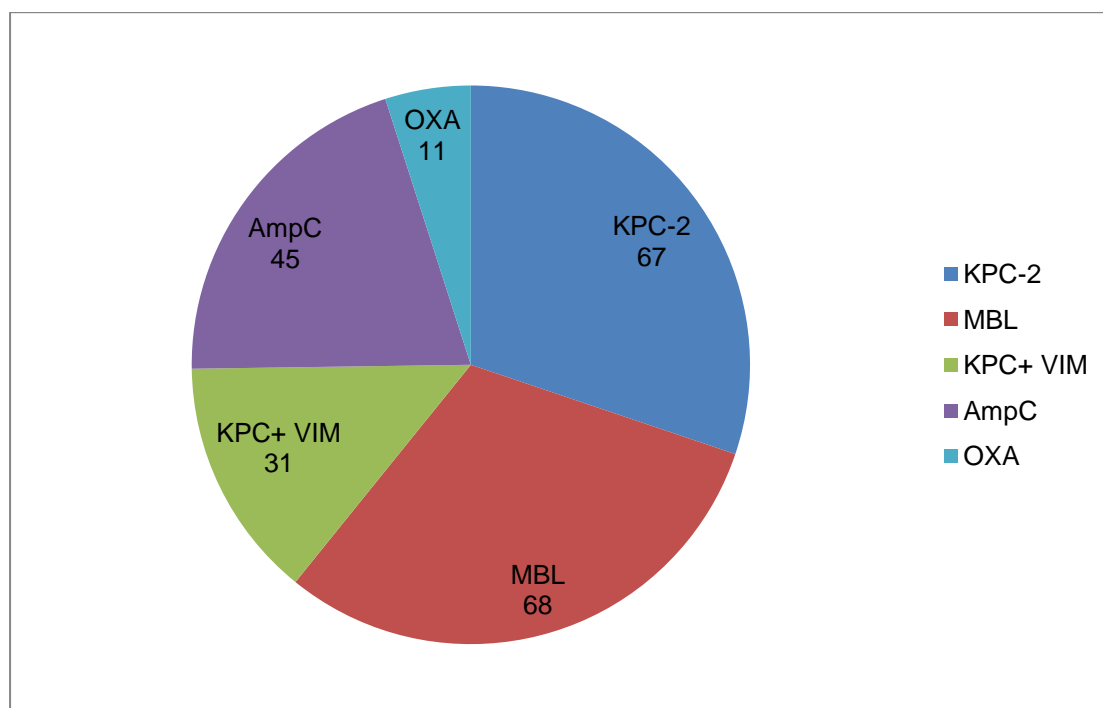
Από τα 162 ESBL- θετικά στελέχη, τα 54 (33,33%) ήταν στελέχη που παρήγαγαν αποκλειστικά ESBLs και ήταν αρνητικά για AmpC-β- λακταμάσες και για καρβαπενεμάσες. Έξι από αυτά ήταν ανθεκτικά στην ερταπενέμη συνεπεία του συνδυασμού της παραγωγής CTX-M-15 με την απώλεια των πορινών. Τα 108 (66,67%) ESBL- θετικά στελέχη παρήγαγαν επιπλέον κι άλλους τύπους β-λακταμασών. Συγκεκριμένα, 83 (51,23%) ESBL- θετικά στελέχη παρήγαγαν ταυτόχρονα καρβαπενεμάσες (35 στελέχη εξέφραζαν την KPC-2, 22 στελέχη εξέφραζαν τη VIM-1, 10 στελέχη παρήγαγαν συγχρόνως KPC-2 και VIM-1, 8 στελέχη εξέφραζαν NDM-1 και 8 στελέχη παρήγαγαν OXA-48). Δεκαεννέα (11,72%) ESBL- θετικά στελέχη παρήγαγαν ταυτόχρονα και πλασμιδιακές AmpC-β- λακταμάσες (15 άνηκαν στο σύμπλεγμα MOX-1, MOX-2, CMY-1 και CMY-8 ως CMY-11. Τα υπόλοιπα 4 άνηκαν στο σύμπλεγμα LAT-1 ως LAT-4, CMY-2 ως CMY-7 και BIL-1). Έξι (3,7%) στελέχη υπερεκφράζαν χρωμοσωμικές AmpCs.

Από τα 139 στελέχη που δεν εκφράζουν ESBLs, τα 94 (67,62%) παρήγαγαν καρβαπενεμάσες (32 ήταν παραγωγείς KPC-2, 33 παρήγαγαν VIM-1, 21 εξέφραζαν συγχρόνως KPC-2 και VIM-1, 5 στελέχη παρήγαγαν NDM-1 και 3 ήταν παραγωγείς OXA-48). Δεκαπέντε στελέχη (10,79%) έφεραν πλασμιδιακά γονίδια AmpCs (2 άνηκαν στο σύμπλεγμα MOX-1, MOX-2, CMY-1 και CMY-8 ως CMY-11. Ένα στέλεχος παρήγαγε DHA-1, ενώ τα υπόλοιπα 12 άνηκαν στο σύμπλεγμα LAT-1 ως LAT-4, CMY-2 ως CMY-7 και BIL-1). Πέντε (3,59%) από τα ESBL- αρνητικά στελέχη υπερεκφράζουν χρωμοσωμικές AmpCs. Τα εναπομείναντα 25 στελέχη, δεν παρήγαγαν ούτε ESBLs ούτε AmpC-β- λακταμάση ή καρβαπενεμάση.

Επίσης, 104 (64,19%) στελέχη από τα ESBL-θετικά και 76 (54,67%) στελέχη από τα ESBL-αρνητικά έφεραν την πλασμιδιακή στενού φάσματος β-λακταμάση TEM-1.

γονίδια		γονίδια	
KPC+ESBL	35	KPC	32
VIM+ESBL	22	VIM	33
NDM-1+ ESBL	8	NDM-1	5
KPC+MBL+ESBL	10	KPC+MBL	21
AmpC+ ESBL	25	AmpC	20
OXA-48+ESBL	8	OXA-48	3
ESBL αποκλειστικά	54	Non-ESBL	25
Total (n=301)	162		139

πίνακας: ταξινόμηση των στελεχών της μελέτης αναλόγως γονοτύπου



κυκλόγραμμα : κατανομή των άλλων τύπων β-λακταμασών.

Παραγωγή άλλων τύπων ισχυρών β-λακταμασών διαπιστώθηκε στα 222 (73,75%) από τα 301 στελέχη εντεροβακτηριακών της μελέτης. Από τα υπόλοιπα στελέχη, τα 25 δεν παράγουν ESBLs (non-ESBLs) και τα 54 είναι στελέχη που παράγουν αποκλειστικά ESBLs.

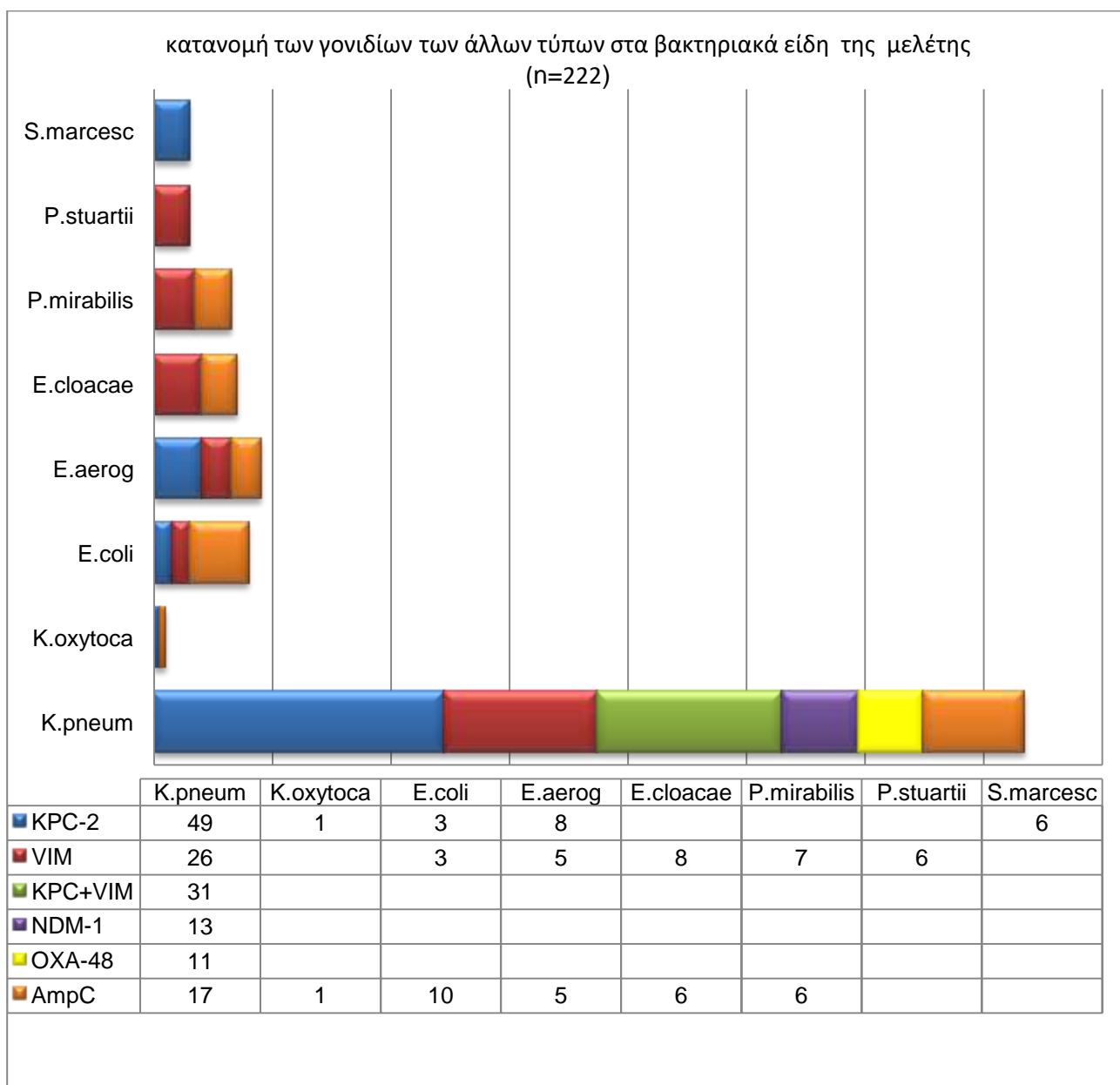
A.4 κατανομή των γονιδίων KPC, MBL και AmpC στα είδη των εντεροβακτηριακών

Από τα 174 στελέχη *K.pneumoniae*, τα 111 είναι ESBL-θετικά και τα υπόλοιπα 63 δεν εκφράζουν ESBLs. Μεταξύ των 111 ESBL-θετικών στελεχών *K.pneumoniae*, τα 72 παράγουν καρβαπενεμάσες (31 στελέχη εκφράζουν KPC-2, 15 στελέχη παράγουν VIM-1, 10 στελέχη συμπαράγουν VIM και KPC, 8 στελέχη εκφράζουν NDM-1 και 8 στελέχη παράγουν OXA-48). Δεκαέξι στελέχη *K.pneumoniae* εκφράζουν AmpCs, ενώ τα υπόλοιπα 23 στελέχη παράγουν αποκλειστικά ESBLs. Από τα 63 αρνητικά για ESBLs στελέχη *K.pneumoniae*, τα 58 παράγουν καρβαπενεμάσες (18 στελέχη εκφράζουν KPC-2, 11 στελέχη παράγουν VIM-1, 21 στελέχη συμπαράγουν VIM και KPC, 5 στελέχη εκφράζουν NDM-1 και 3 στελέχη παράγουν OXA-48) και ένα παράγει πλασμιδιακή AmpC. Από τα 5 στελέχη *K.oxytoca*, 1 στέλεχος εκτός από ESBL παράγει και KPC-2, ενώ από τα 3 συνολικά ESBL-αρνητικά, το 1 παράγει πλασμιδιακή AmpC.

Από τα 42 στελέχη *E.coli*, τα 26 είναι ESBL-θετικά και τα υπόλοιπα 16 δεν παράγουν ESBLs. Μεταξύ των 26 ESBL-θετικών στελεχών *E.coli*, ένα παράγει την καρβαπενεμάση KPC-2 και 3 στελέχη εκφράζουν πλασμιδιακές AmpCs. Τα υπόλοιπα 22 στελέχη παράγουν αποκλειστικά ESBLs. Από τα 16 αρνητικά για ESBLs στελέχη *E.coli*, τα 5 παράγουν καρβαπενεμάσες (2 στελέχη εκφράζουν KPC-2 και 3 στελέχη παράγουν VIM-1) και 7 παράγουν πλασμιδιακές AmpCs.

Από τα 24 στελέχη *E.aerogenes*, τα 12 είναι ESBL-θετικά και τα άλλα 12 δεν εκφράζουν ESBLs. Μεταξύ των 12 ESBL-θετικών στελεχών *E.aerogenes*, τα 5 παράγουν καρβαπενεμάσες (2 στελέχη εκφράζουν KPC-2 και 3 στελέχη παράγουν VIM-1) και 3 υπερπαράγουν χρωμοσωμική AmpC-β- λακταμάση. Από τα 12 αρνητικά για ESBLs στελέχη *E.aerogenes*, τα 8 παράγουν καρβαπενεμάσες (6 στελέχη εκφράζουν KPC-2 και 2 στελέχη παράγουν VIM-1) και δυο στελέχη υπερεκφράζουν χρωμοσωμική AmpC. Από τα 17 στελέχη *E.cloacae* της μελέτης, τα 3 είναι ESBL-θετικά και υπερπαράγουν χρωμοσωμική AmpC-β- λακταμάση. Από τα υπόλοιπα 14 στελέχη *E.cloacae*, που είναι αρνητικά για ESBLs, τα 8 παράγουν καρβαπενεμάση (τη VIM-1), ενώ τρία στελέχη υπερεκφράζουν χρωμοσωμική AmpC.

Από τα 21 στελέχη *P.mirabilis*, τα 17 είναι αρνητικά για παραγωγή ESBLs, όμως 7 από αυτά παράγουν επιπροσθέτως την καρβαπενεμάση VIM-1 και 6 εκφράζουν πλασμιδιακές AmpCs. Από τα 9 στελέχη *P.stuartii*, τα 4 είναι θετικά για παραγωγή ESBLs και τα υπόλοιπα 5 δεν παράγουν καμία ESBLs. Τα 4 θετικά για ESBLs στελέχη *P.stuartii* εκφράζουν την καρβαπενεμάση VIM-1. Από τα 5 αρνητικά για ESBLs στελέχη *P.stuartii*, τα 2 παράγουν την VIM-1. Στη συλλογή μας, τα 9 στελέχη *S.marcescens* δεν παράγουν ESBLs, 6 από αυτά εκφράζουν την καρβαπενεμάση KPC-2.



Η κατανομή των γονιδίων των διάφορων τύπων β-λακταμασών μεταξύ των εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBLs και εκείνων που δεν παράγουν φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

κατανομή των γονιδίων των β-λακταμασών μεταξύ των ESBL-θετικών και των ESBL-αρνητικών στελεχών

Strain group and genotype(s)	No. of isolates								
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 174)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n = 5)	<i>Escherichia coli</i> (n = 42)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (n = 24)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n = 17)	<i>Proteus mirabilis</i> (n = 21)	<i>Providencia stuartii</i> (n = 9)	<i>Serratia marcescens</i> (n = 9)	Total (n = 301)
ESBL-producing isolates (n = 162)^a									
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	6		5	1		4			16
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	5	1	5						11
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + porin deficient	6								6
<i>bla</i> _{CTX-M-32}			1						1
<i>bla</i> _{SHV-5}	6		5	3					14
<i>bla</i> _{GES-7}			2						2
<i>bla</i> _{SHV-5} + <i>bla</i> _{CTX-M-3}			4						4
<i>bla</i> _{CMY-1-like} + <i>bla</i> _{SHV-5}	13		2						15
<i>bla</i> _{CMY-2-like} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	2		1						3
<i>bla</i> _{CMY-2-like} + <i>bla</i> _{SHV-5} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	1								1
<i>bla</i> _{SHV-5} + AmpC hyperproducers				3	3				6
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	4								4
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{SHV-12}	24	1	1						26
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	3								3
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{SHV-5}				2					2
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{VIM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}	9								9
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{VIM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	1								1
<i>bla</i> _{VIM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-3}	3								3
<i>bla</i> _{VIM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	4								4
<i>bla</i> _{VIM-1} + <i>bla</i> _{SHV-5}	8			3		4			15
<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	8								8
<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTX-M-15}	8								8
Subtotal	111	2	26	12	3	4	4		162
Non-ESBL-producing isolates (n = 139)^b									
Non-expanded-spectrum β-lactamase producers	4	2	4	2	3	4	3	3	25
<i>bla</i> _{CMY-1-like}			2						2
<i>bla</i> _{CMY-2-like}		1	5			6			12
<i>bla</i> _{DHA-1}	1								1
AmpC hyperproducers				2	3				5
<i>bla</i> _{KPC-2}	18		2	6				6	32
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{VIM-1}	21								21
<i>bla</i> _{VIM-1}	11		3	2	8	7	2		33
<i>bla</i> _{NDM-1}	5								5
<i>bla</i> _{OXA-48}	3								3
Subtotal	63	3	16	12	14	17	5	9	139

^aThe *bla*_{TEM-1} gene was detected in 104 of the ESBL-producing isolates.

^bThe *bla*_{TEM-1} gene was detected in 76 of the non-ESBL-producing isolates.

A.5 επίπεδα ευαισθησίας των εξεταζομένων στελεχών

Οι τιμές MICs , MIC₅₀ και MIC₉₀ , καθώς και το εύρος στα διάφορα αντιβιοτικά , για τα στελέχη που παράγουν ESBLs και για εκείνα που δεν παράγουν ESBLs, παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Οι όροι MIC₅₀ και MIC₉₀ αντιπροσωπεύουν την ελάχιστη συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη του 50% και του 90% αντίστοιχα των υπό εξέταση στελεχών. Το εύρος (range) καθορίζεται από τις δυο ακραίες τιμές , τη μικρότερη και τη μεγαλύτερη, που παρατηρήθηκαν για τα στελέχη της μελέτης.

Λόγω της σύγχρονης παραγωγής επιπρόσθετων β-λακταμασών, οι τιμές των ανωτέρω παραμέτρων δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ESBL-θετικών και των ESBL- αρνητικών.

επίπεδα ευαισθησίας στα β-λακταμικά αντιβιοτικά για τα 162 στελέχη που παράγουν ESBLs και για τα 139 στελέχη που δεν παράγουν ESBLs

Strain group and antimicrobial	MIC values (μg/ml)			% of isolates resistant
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
ESBL-producing isolates (n = 162)				
Aztreonam	8 to >256	256	>256	80.2
Cefepime	1 to 128	32	128	71.6
Cefoxitin	1 to 256	32	256	64.8
Cefotaxime	1 to >128	64	>128	91.4
Ceftazidime	2 to >256	128	>256	86.4
Ertapenem	0.125 to 128	16	64	56.8
Imipenem	0.250 to 128	2	32	48.8
Meropenem	0.125 to 64	4	32	51.9
Piperacillin-tazobactam	2 to >256	128	>256	67.3
Non-ESBL-producing isolates (n = 139)				
Aztreonam	1 to >256	4	256	40.3
Cefepime	0.5 to 128	32	64	59.7
Cefoxitin	0.5 to 256	64	256	79.1
Cefotaxime	0.250 to 128	64	128	76.9
Ceftazidime	0.5 to 256	128	256	78.4
Ertapenem	0.125 to 128	32	128	67.6
Imipenem	0.250 to 64	16	64	64.7
Meropenem	0.125 to 64	16	32	63.3
Piperacillin-tazobactam	2 to >256	128	>256	76.9

A.6 αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης

A.6.1. CLSI ESBL confirmatory test

Εφαρμόζοντας τη φαινοτυπική δοκιμασία που συστήνει το CLSI στα 301 στελέχη εντεροβακτηριακών, διαπιστώθηκε ότι σε 106 από τα 162 γονοτυπικά επιβεβαιωμένα για την παραγωγή ESBLs στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX/CA ή CAZ/CA ίση ή μεγαλύτερη των 5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX ή CAZ και η δοκιμασία θεωρήθηκε θετική για την παραγωγή ESBLs. Η ευαισθησία δηλαδή είναι 65,43%.

Συγκεκριμένα, σε 52(32,1%) από τα 162 στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση ίση ή μεγαλύτερη των 5mm γύρω από τους δίσκους και των δύο αντιβιοτικών των συνδυασμένων με κλαβουλανικό , σε 43 (26,5%) στελέχη εμφανίστηκε αύξηση μόνο γύρω από το δίσκο κεφταζιδίμης –κλαβουλανικού και σε 11 (6,8%) στελέχη η αύξηση παρατηρήθηκε μόνο γύρω το δίσκο της κεφοταξίμης-κλαβουλανικού (πίνακας I) .

Να σημειωθεί ότι το CLSI ESBL confirmatory test μπόρεσε να εντοπίσει την παραγωγή ESBLs σε 4 (13,3%) από τα 30 στελέχη που παράγουν ταυτόχρονα MBL και ESBL (MBL/ESBL - παραγωγείς) και σε κανένα από τα 10 στελέχη που συμπαράγουν KPC και MBLκαι ESBL (KPC/MBL/ESBL - παραγωγείς).

Το τεστ απέδωσε 4 ψευδώς θετικά αποτελέσματα ,τα 2 αφορούσαν στελέχη που παρήγαγαν MBL και τα άλλα 2 , στελέχη που εξέφραζαν AmpCs. Η ειδικότητα , επομένως, είναι 97,1%.

A.6.2. Τροποποιημένο CLSI ESBL confirmatory test με προσθήκη PBA και EDTA

Εφαρμόζοντας στα 301 στελέχη της μελέτης την τροποποιημένη φαινοτυπική δοκιμασία, στην οποία προσθέσαμε 400μg φαινυλβορονικού(PBA) και 292μg EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών , διαπιστώθηκε ότι σε 158 από τα 162 γονοτυπικά επιβεβαιωμένα για την παραγωγή ESBLs στελέχη, παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX/CA/PBA/EDTA ή

CAZ/CA/PBA/EDTA κατά τουλάχιστον 5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX /PBA/EDTA ή CAZ/PBA/EDTA και η δοκιμασία θεωρήθηκε θετική για την παραγωγή ESBLs. Η ευαισθησία δηλαδή είναι 97,5%.

Συγκεκριμένα, σε 106 (65,4%) από τα 162 ESBL-θετικά στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση ίση ή μεγαλύτερη των 5mm γύρω από τους δίσκους και των δύο αντιβιοτικών των συνδυασμένων με κλαβουλανικό, PBA και EDTA, σε 35 (21,6%) στελέχη εμφανίστηκε αύξηση γύρω μόνο από το δίσκο κεφταζιδίμης-κλαβουλανικού-PBA-EDTA και σε 17 (10,5%) στελέχη η αύξηση παρατηρήθηκε γύρω μόνο από το δίσκο της κεφτοαξίμης-κλαβουλανικού-PBA-EDTA (πίνακας I).

Να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με το CLSI ESBL confirmatory test, το τροποποιημένο τεστ μπόρεσε να εντοπίσει την παραγωγή ESBLs σε όλα τα στελέχη που παράγουν μαζί KPC και ESBL (KPC/ESBL - παραγωγείς) ή που παράγουν μαζί AmpC-β-λακταμάσες και ESBL (AmpC / ESBL - παραγωγείς), όπως επίσης ανίχνευσε την παραγωγή των ESBLs σε 29 (96,7%) από τα 30 στελέχη που εκτός από ESBLs παράγουν και MBL (MBL/ESBL- παραγωγείς) και σε 9 (90%) από τα 10 στελέχη που παράγουν ταυτόχρονα KPC, MBL και ESBLs (KPC/MBL/ESBL - παραγωγείς).

Το τροποποιημένο τεστ δεν βγήκε θετικό σε κανένα από τα 139 στελέχη που δεν παράγουν ESBLs. Η ειδικότητά του, επομένως, είναι 100%.

πίνακας I: κατανομή των θετικών αποτελεσμάτων ανά δοκιμασία, με βάση το είδος του αντιβιοτικού

γονότυπος	CAZ	CTX	CAZ +CTX		CAZ	CTX	CAZ+ CTX
KPC + ESBL (n=35)	17	1	5		6	1	28
MBL + ESBL (n=30)	4	-	-		4	-	25
KPC+VIM+ESBL (n=10)	-	-	-		6	1	2
AmpC + ESBL (n=25)	13	1	4		11	-	14
OXA-48 + ESBL (n=8)	-	-	8		-	-	8
ESBL (n=54)	9	9	35		8	15	29
Total (n=162)	43	11	52		35	17	106
	CLSI –ESBL τεστ				τροποποιημένο CLSI –ESBL τεστ		

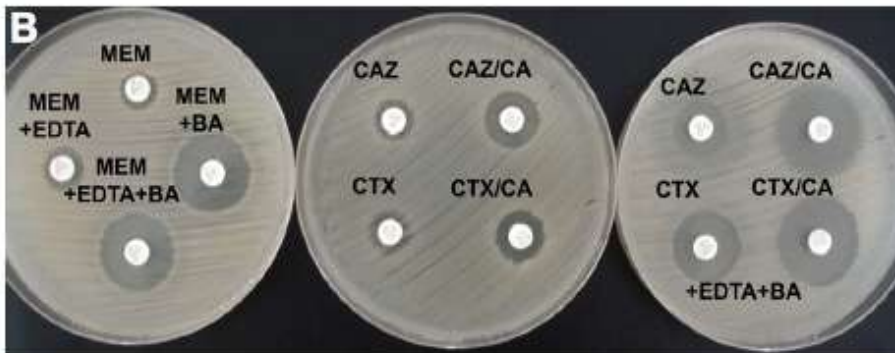
δοκιμασία ανίχνευσης και διάκρισης καρβαπενεμασών με δίσκους μεροπενέμης (χωρίς ή με βορονικό και EDTA)

CLSI-ESBL test

τροποποιημένο τεστ



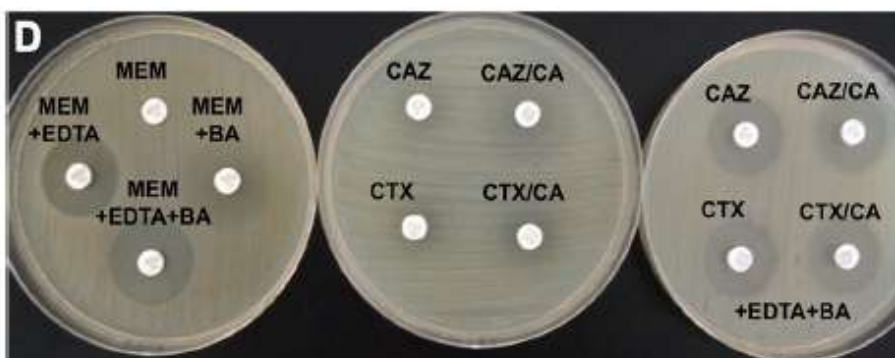
KPC+VIM+ESBL



KPC + ESBL



VIM+ ESBL



VIM

αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα του CLSI-ESBL test και του τροποποιημένου τεστ (modified CLSI-ESBL confirmatory test)

πίνακας αποτελεσμάτων της φαινοτυπικής ανίχνευσης των ESBLs μεταξύ 162 ESBL-θετικών στελεχών και 139 ESBL- αρνητικών στελεχών εντεροβακτηριακών εφαιμόζοντας το **CLSI ESBL confirmatory test** και το **Τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test)**

ESBL screening method	No. (%) of isolates confirmed by PCR to have the indicated phenotype	Test performance (%) ^a			
		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
	KPC- and ESBL-producing isolates (n = 35)	KPC- and non-ESBL-producing isolates (n = 32)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	23 (65.7)	65.7	100	100	72.7
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	35 (100)	100	100	100	100
	MBL- and ESBL-producing isolates (n = 30)	MBL- and non-ESBL-producing isolates (n = 38)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	4 (13.3)	13.3	94.7	66.7	60
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	29 (96.7)	96.7	100	100	97.4
	KPC-, MBL-, and ESBL-producing isolates (n = 10)	KPC-, MBL-, and non-ESBL-producing isolates (n = 21)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	0 (0)	0	100	0	67.7
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	9 (90)	90	100	100	95.5
	AmpC- and ESBL-producing isolates (n = 25)	AmpC- and non-ESBL-producing isolates (n = 20)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	18 (72)	72	90	90	72
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	25 (100)	100	100	100	100
	OXA-48- and ESBL-producing isolates (n = 8)	OXA-48- and non-ESBL-producing isolates (n = 3)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	8 (100)	100	100	100	100
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	8 (100)	100	100	100	100
	Only ESBL-producing isolates (n = 54)	Non-ESBL-producing isolates (n = 25)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	53 (98.1)	98.1	100	100	96.2
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	52 (96.3)	96.3	100	100	92.6
	Total ESBL-producing isolates (n = 162)	Total non-ESBL-producing isolates (n = 139)			
CLSI ESBL confirmatory test ^b	106 (65.4)	65.4	97.1	96.4	70.7
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^c	158 (97.5)	97.5	100	100	97.2

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^b CTX-CA versus CTX and/or CAZ-CA versus CAZ.

^c CTX-CA-BA-EDTA versus CTX-BA-EDTA and/or CAZ-CA-BA-EDTA versus CAZ-BA-EDTA.

A.6.3. Αυξήσεις στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής

Μεταξύ των θετικών για παραγωγή ESBLs στελεχών, γονοτυπικά επιβεβαιωμένων, το τροποποιημένο τεστ ενίσχυσε σημαντικά την αύξηση στη διάμετρο των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους αντιβιοτικών. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές μεταξύ των θετικών για την παραγωγή ESBL-στελεχών που επίσης παρήγαγαν καρβαπενεμάσες (KPC ή VIM ή NDM-1 ή και το συνδυασμό KPC/VIM) ή AmpC-β-λακταμάσες. Στα στελέχη αυτά, η ενίσχυση της αύξησης της διαμέτρου της ζώνης αναστολής ήταν μεγαλύτερη στους δίσκους κεφταζιδίμης-κλαβουλανικού-PBA-EDTA συγκριτικά με τους δίσκους κεφταζιδίμης-κλαβουλανικό-PBA-EDTA, καθώς η πλειοψηφία αυτών των στελεχών εξέφραζε SHV-ESBLs. Η κεφταζιδίμη θεωρείται από τα καλύτερα υποστρώματα για τις SHV-ESBLs και ειδικότερα για τη SHV-5.

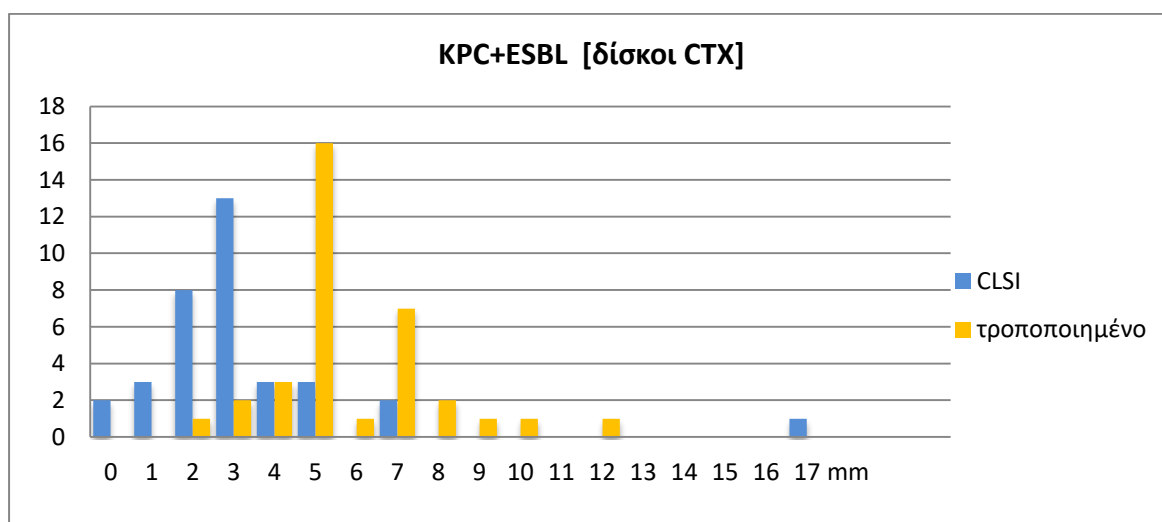
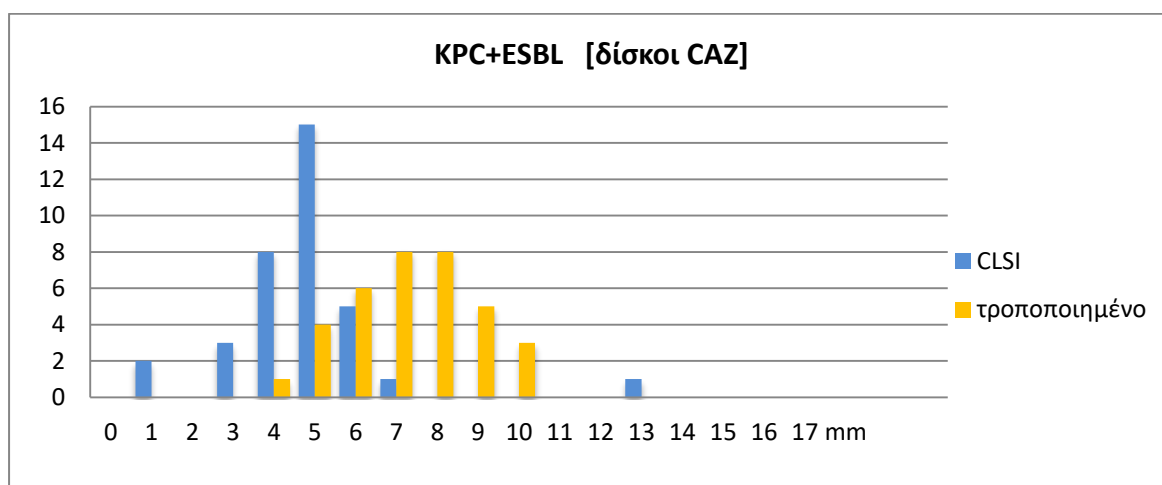
Στον πίνακα A, παρουσιάζονται ανά φαινοτυπική δοκιμασία (CLSI-ESBL test και τροποποιημένο), οι μέσες διαφορές σε mm στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής στα εξεταζόμενα ESBL-θετικά κλινικά στελέχη.

γονότυποι στελεχών (n=162)	μέσες αυξήσεις (σε mm) στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής			
	CLSI ESBL confirmatory test		τροποποιημένο τεστ	
	CAZ-CA/CAZ	CTX-CA/CTX	CAZ-CA-BA-EDTA/CAZ-BA-EDTA	CTX-CA-BA-EDTA/CTX-BA-EDTA
KPC/ESBL producers (28 SHV type, 4 CTX-M type, 3 SHV + CTX-M type)	3.9	3.3	7.3	5.8
VIM/ESBL producers (15 SHV type, 7 CTX-M type)	3.8	1.0	8.6	8.3
NDM/ESBL producer (8 CTX-M type)	3.1	2.2	8.3	10.2
KPC/VIM/ESBL producers (9 SHV type, 1 CTX-M type)	2.6	1.3	7.4	4.0
AmpC/ESBL producers (21 SHV type, 3 CTX-M type, 1 SHV + CTX-M type)	8.9	3.7	9.3	5.8
OXA-48/ESBL producers (8 CTX-M type)	5.8	6.9	6.5	6.4
Only ESBL producers (14 SHV type, 34 CTX-M type, 2 IBC type, 4 SHV + CTX-M type)	8.9	12.0	8.5	10.9

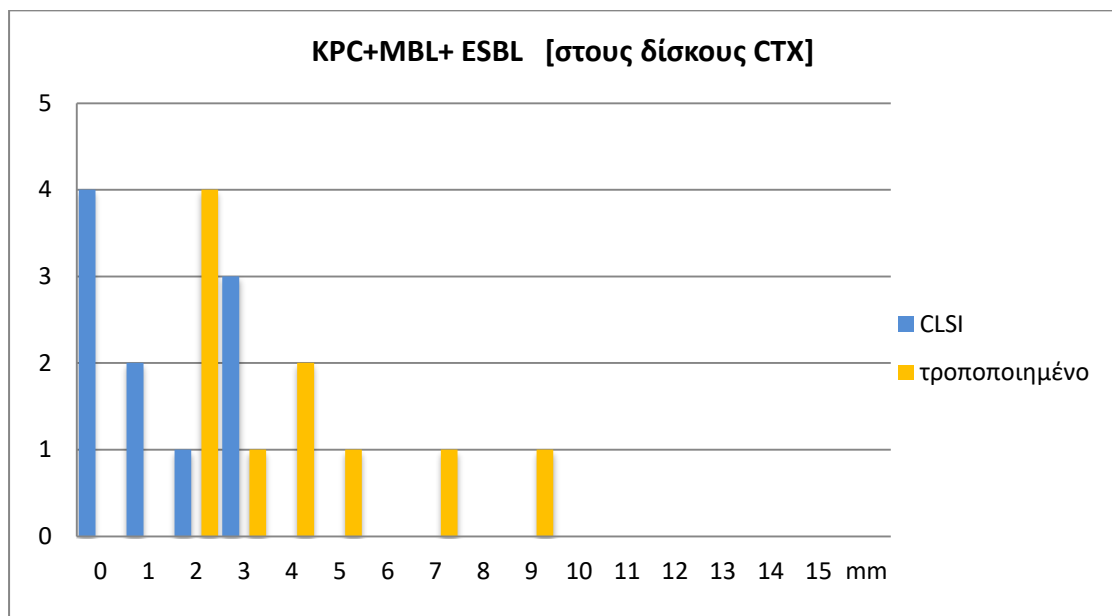
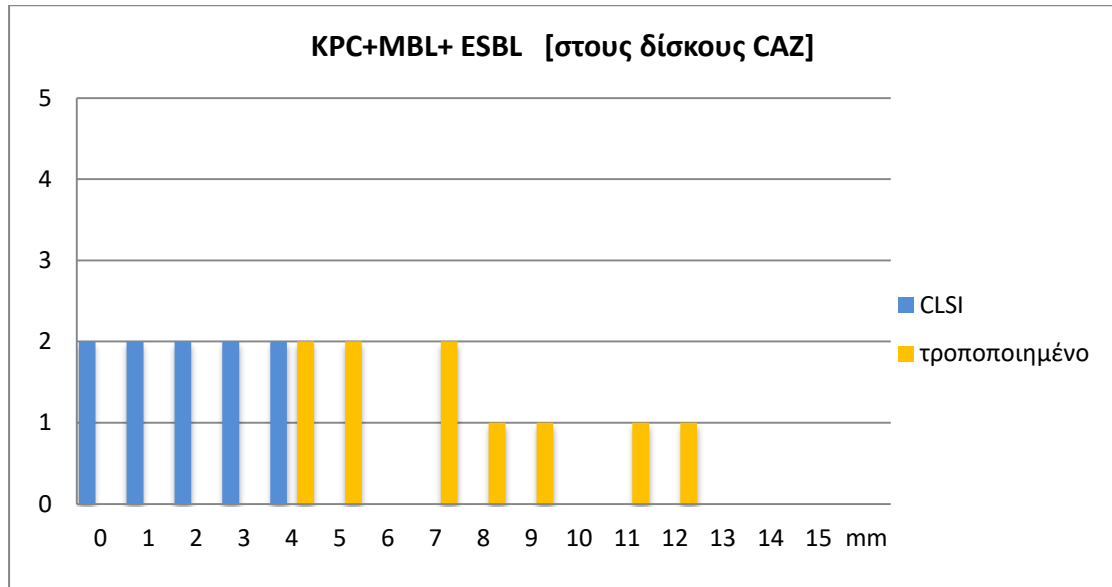
πίνακας A: μέσες διαφορές σε mm στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής ανά φαινοτυπική δοκιμασία (CLSI-ESBL test και τροποποιημένο CLSI-ESBL test).

Στα κάτωθι διαγράμματα αποτυπώνονται ανά κατηγορία ESBL-θετικών στελεχών και ανά είδος αντιβιοτικού, η κατανομή των αυξήσεων στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ/CA και CTX/CA συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX ή CAZ στο CLSI –ESBL test και στο τροποποιημένο με προσθήκη PBA και EDTA τεστ. Αύξηση ίση ή μεγαλύτερη των 5mm θετικοποιεί το τεστ. Παρατηρούμε ότι το τροποποιημένο τεστ (κίτρινο χρώμα) ενίσχυσε σημαντικά την αύξηση στη ζώνη αναστολής υποδηλώνοντας τη ανασταλτική δράση του συνδυασμού του βορονικού και του EDTA εναντίον της δράσης των καρβαπενεμασών και των AmpCs, οδηγώντας στην αποκάλυψη των κρυμμένων ESBLs. Αναλυτικότερα:

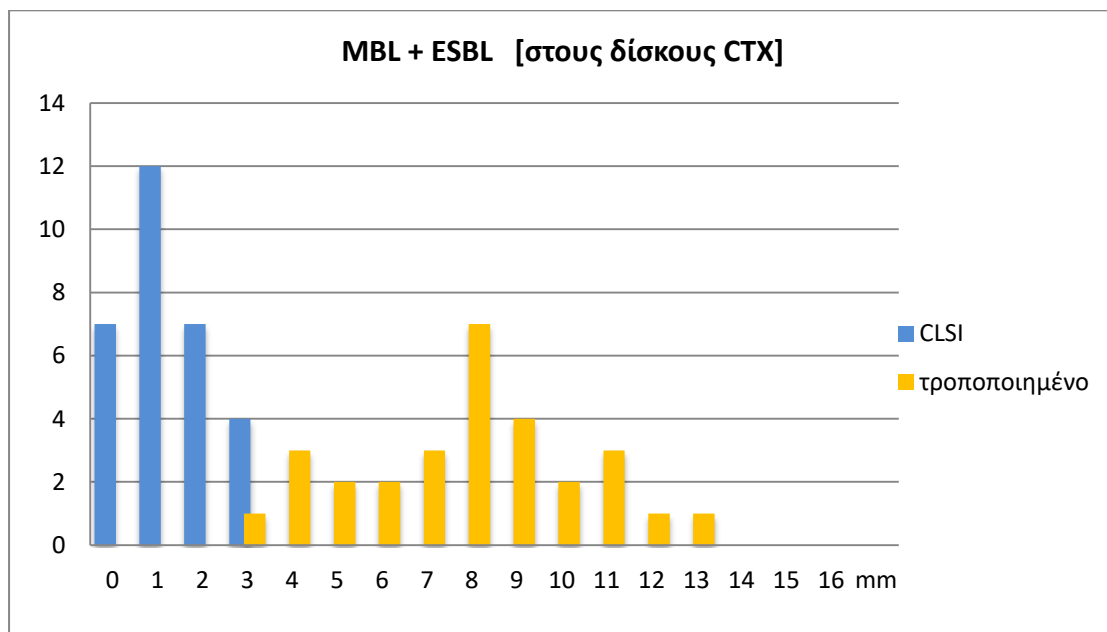
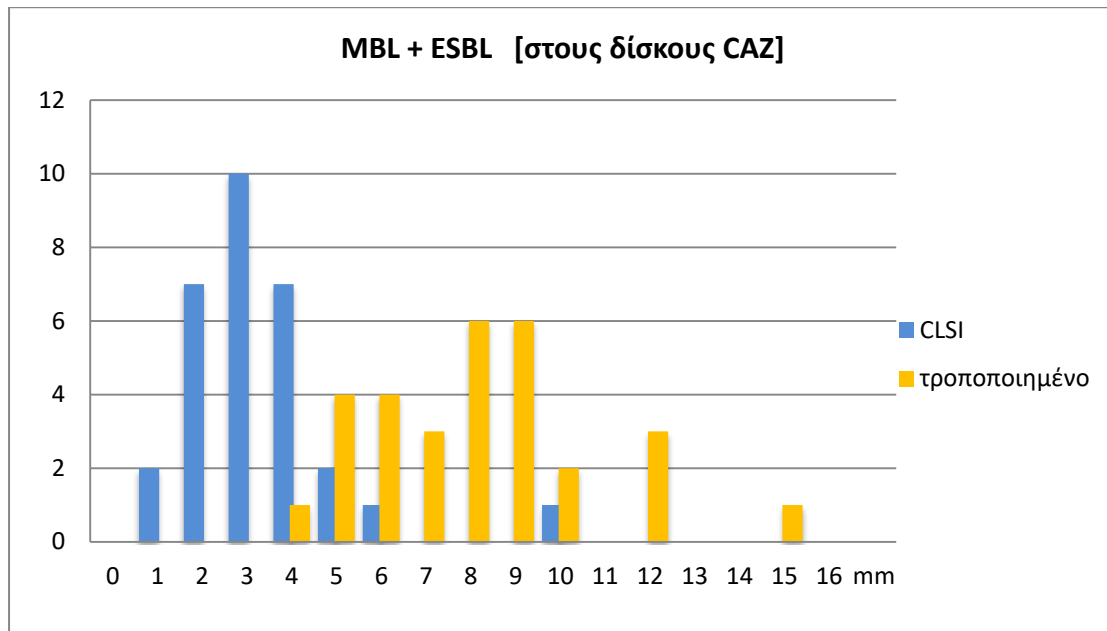
Από τα 35 στελέχη της συλλογής που παρήγαγαν KPC και ESBL, το τροποποιημένο τεστ εντόπισε την παραγωγή ESBLs και στα 35 στελέχη, σε αντίθεση με το CLSI τεστ, που την εντόπισε σε 23. Οι αυξήσεις ανά είδος αντιβιοτικού κατανέμονται ως εξής



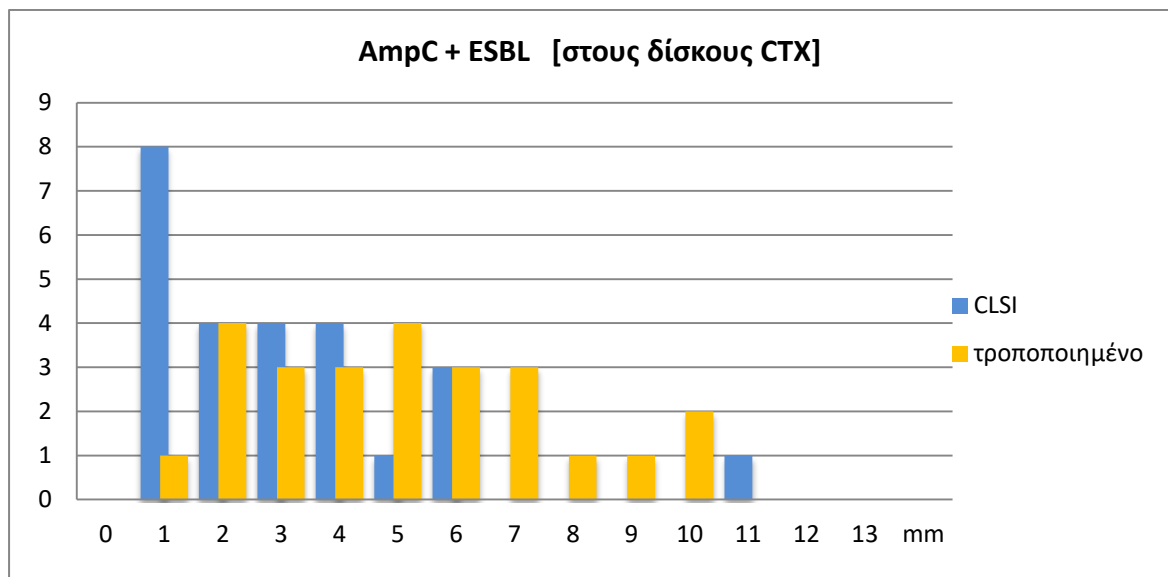
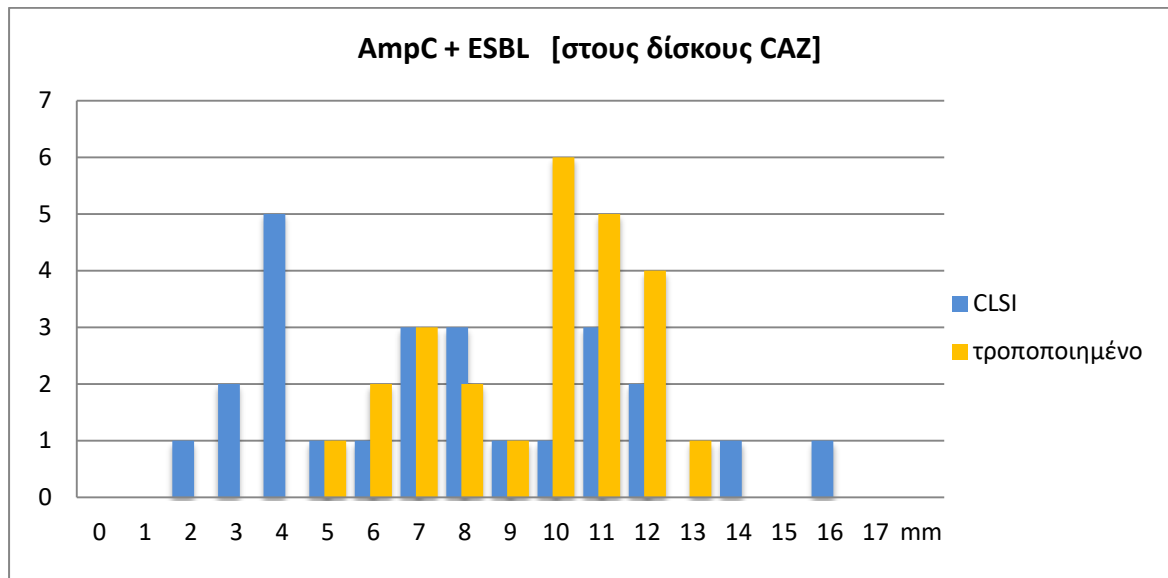
Από τα 10 στελέχη της μελέτης που, εκτός από ESBLs , παράγουν και MBL και KPC,το τροποποιημένο τεστ εντόπισε την παραγωγή ESBLs σε 9 από αυτά ,ενώ το CLSI- test σε κανένα. Οι αυξήσεις ανά είδος αντιβιοτικού κατανέμονται ως εξής:



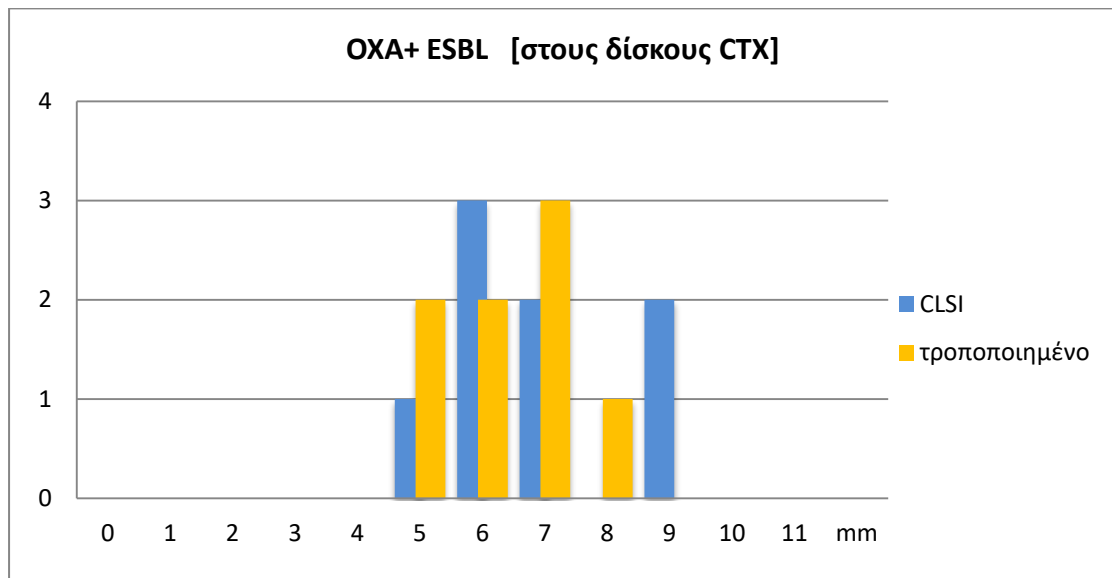
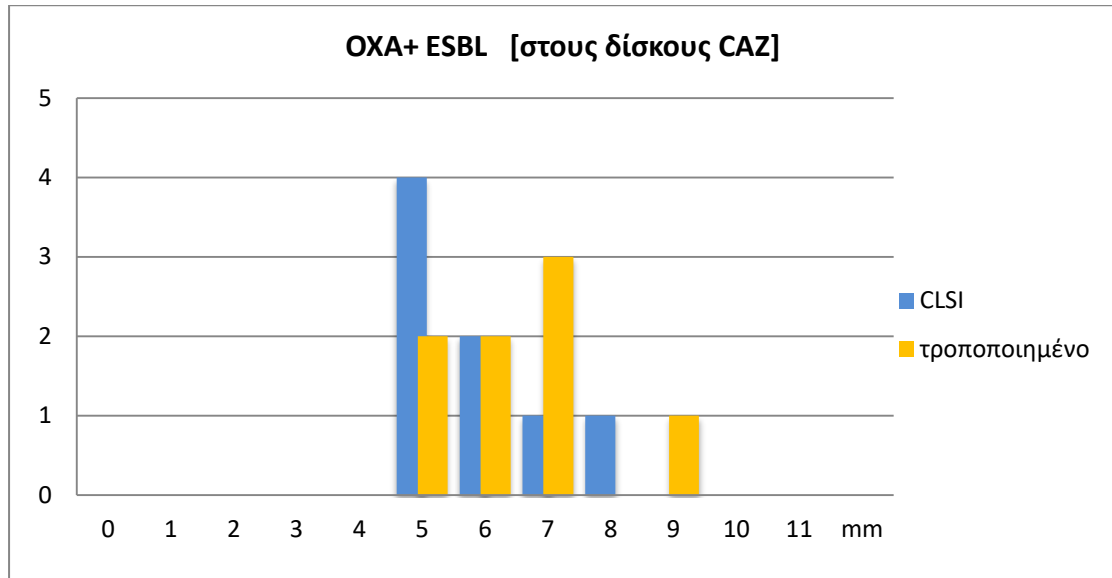
Από τα 30 στελέχη της μελέτης που παράγουν και MBL και ESBLs ,το τροποποιημένο τεστ εντόπισε την παραγωγή ESBLs στα 29 , ενώ το CLSI- test σε 4 στελέχη. Οι αυξήσεις ανά είδος αντιβιοτικού κατανέμονται ως εξής :



Από τα 25 στελέχη της μελέτης που επιπλέον των ESBLs παράγουν και AmpC-β-λακταμάσες, το τροποποιημένο τεστ εντόπισε την παραγωγή ESBLs και στα 25 στελέχη, εν αντιθέσει με το CLSI- test , που την εντόπισε σε 18. Οι αυξήσεις ανά είδος αντιβιοτικού κατανέμονται ως εξής :

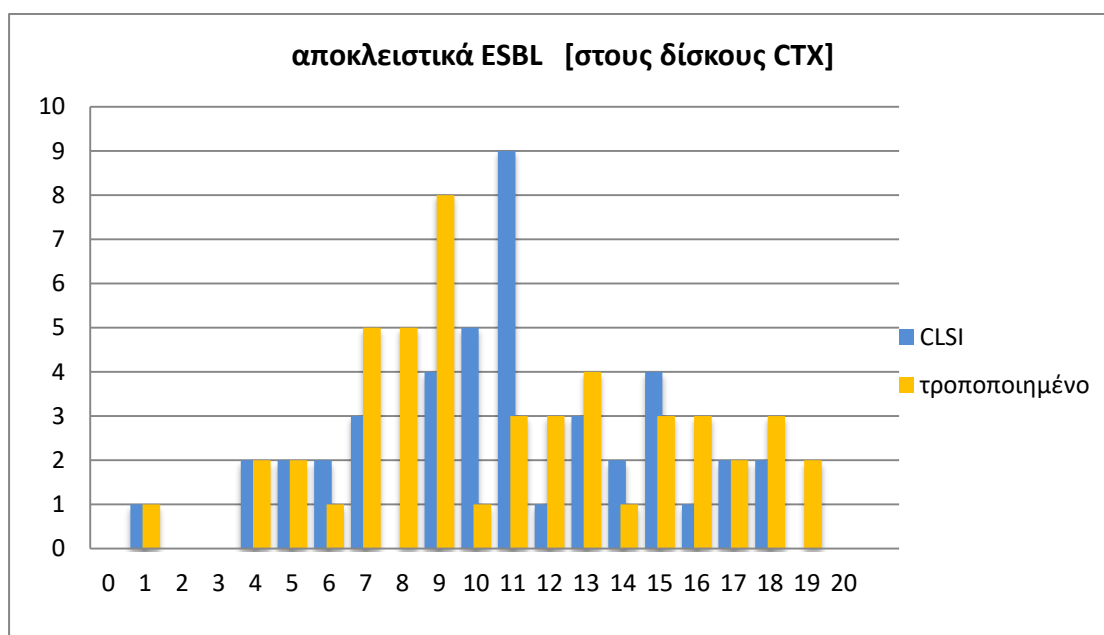
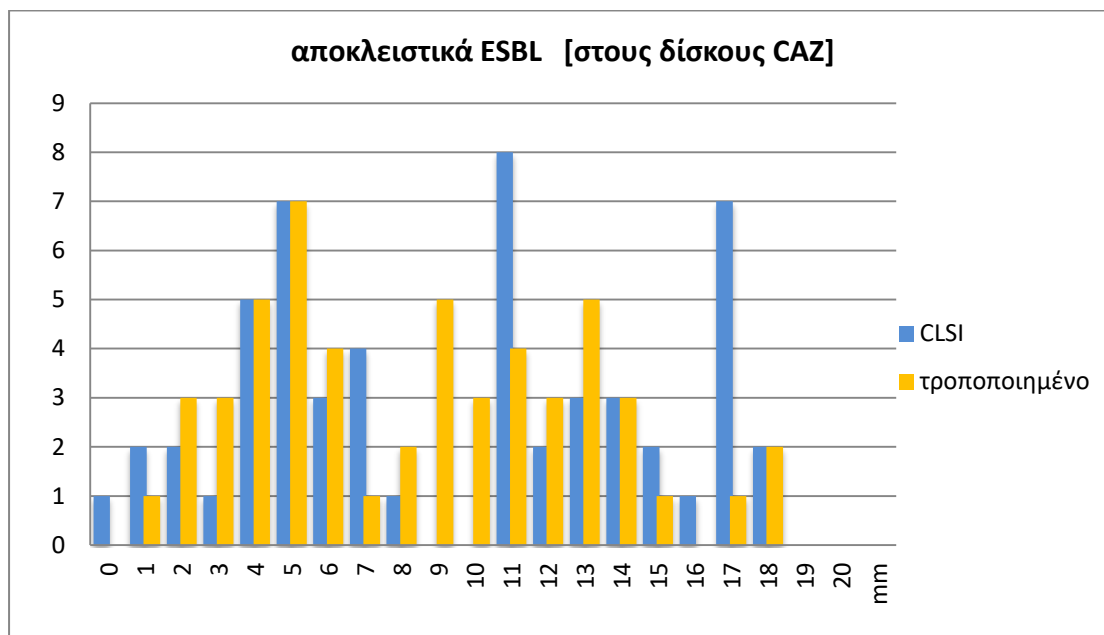


Όσον αφορά στα στελέχη που εκτός από ESBLs εκφράζουν και την καρβαπενεμάση OXA-48, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 2 τεστ. Η κατανομή των αυξήσεων ανά είδος αντιβιοτικού είναι η εξής:



Όσον αφορά στα στελέχη που παράγουν αποκλειστικά ESBLs δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 2 τεστ. Το τροποποιημένο τεστ ήταν ισάξιο με το CLSI- test . Στην κατηγορία αυτή των στελεχών συμπεριλάβαμε και 6 στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην ερταπενέμη λόγω του συνδυασμού της παραγωγής ESBL με απώλεια πορίνης.

Η κατανομή των αυξήσεων ανά είδος αντιβιοτικού είναι η εξής:



B. *P.aeruginosa*

Η *P.aeruginosa* είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο, που δεν ζυμώνει τη γλυκόζη (αζυμωτικό). Είναι ευρέως διαδεδομένο ευκαιριακό παθογόνο, βρίσκεται παντού στη φύση και κυρίως σε υδάτινα περιβάλλοντα, πολλές φορές στις βρύσες και στις αποχετεύσεις των ΜΕΘ. Τα ανθεκτικά στελέχη φαίνονται να επιλέγονται στις ΜΕΘ και στις μονάδες εγκαυμάτων και μέσω της φορείας των ασθενών και των χεριών του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού να μεταφέρονται και στις υπόλοιπες κλινικές. Αποτελεί κύριο αίτιο σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων. Είναι το συχνότερο αίτιο πνευμονίας σχετιζόμενης με αναπνευστήρα (VAP) και λοιμώξεων εγκαυμάτων, ενώ είναι το πιο συχνό παθογόνο σε ασθενείς με κυστική ίνωση ή με χρόνιες πνευμονικές παθήσεις, όπως βρογχεκτασίες και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD). Η *P.aeruginosa* είναι δύσκολο να εκριζωθεί από τα νοσοκομειακά περιβάλλοντα λόγω της εγγενούς αντίστασης της σε πολλά απολυμαντικά και αντιμικροβιακά. Η συχνότητα απομόνωσης πολυανθεκτικών στελεχών *P.aeruginosa* αυξάνεται παγκοσμίως, αν και με άνιση κατανομή, από 1% ως 50% ανάλογα με το νοσοκομείο και τη γεωγραφική περιοχή. Η Ελλάδα κατέχει μία από τις υψηλότερες θέσεις μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών στη συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών [345,448-451,567].

Η *P.aeruginosa* χαρακτηρίζεται από εγγενή αντοχή στην αμπικιλίνη, στις κεφαλοσπορίνες πρώτης και δεύτερης γενεάς, στην κεφοταξίμη και την κεφτριαξόνη, στην χλωραμφενικόλη, στην τριμεθοπρίμη, στην καναμυκίνη και στη νεομυκίνη, στις τετρακυκλίνες και την τυγκεκυκλίνη. Η εγγενής αντοχή οφείλεται: α) στη σταθερή έκφραση της χρωμοσωμικής AmpC β -λαταμάσης, της χρωμοσωμικής PoxB οξακιλλινάσης και της πρόσφατα ανακαλυφθείσας μιπενεμάσης PA5542 [449-453,569] β) την παρουσία συστημάτων αντλιών εκροής (πχ MexAB-OprM, MexCD-OprJ). Στην *P.aeruginosa* έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 12 συστήματα, όλα της υπεροικογένειας RND [449-453,567] γ) στη μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα λόγω της παρουσίας των πορινών OprF και των OprD, που είναι στενά κανάλια, διαμέσου των οποίων φυσιολογικά περνούν πολύ λίγα και μικρά μόρια [345, 449-453,567]

Η επίκτητη αντοχή της *P.aeruginosa* οφείλεται σε μεταλλάξεις στα ήδη υπάρχοντα γονίδια που επιφέρουν α) τροποποίηση πρωτεϊνικών μορίων - στόχων . Οπότε προκύπτουν μεταλλαγμένες PBPs ή μεταλλαγμένες τοποϊσομεράσες II και IV ή και τροποποιημένες πορίνες β) υπερέκφραση της χρωμοσωμικής AmpC-β-λακταμάσης γ) υπερέκφραση των αντλιών εκροής και δ) απώλεια των πορινών.

Παράλληλα, η επίκτητη αντοχή της *P.aeruginosa* οφείλεται στην ικανότητα της να αποκτά επιπρόσθετα γονίδια αντοχής μέσω της οριζόντιας μεταφοράς (HGT) πλασμιδίων και τρανσποζονίων. Με αυτόν τον τρόπο πλέον , η *P.aeruginosa* έχει αποκτήσει την ικανότητα παραγωγής τροποποιητικών ενζύμων , συμπεριλαμβανομένων των ESBLs και των καρβαπενεμασών, συχνότερα της τάξης των MBLs, ανοίγοντας ένα νέο κεφάλαιο στην αντοχή [449-455,567].

Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες περιγράφονται με ολοένα και μεγαλύτερη συχνότητα στην *P.aeruginosa*. Η PER-1 ήταν η πρώτη ESBL που ανακαλύφθηκε το 1993 σε στέλεχος *P.aeruginosa*, που απομονώθηκε από Τούρκο ασθενή που νοσηλευόταν στη Γαλλία. Είναι ευρέως διαδεδομένη στην Τουρκία ,αλλά και σε χώρες της δυτικής Ευρώπης , την Ιαπωνία και την Κορέα. Πρόσφατα εντοπίστηκε και στην Ελλάδα. Έχουν εντοπιστεί σε στελέχη *P.aeruginosa* και άλλοι τύποι ESBLs , όπως πχ GES, VEB,TEM,SHV,CTX-M [357,358,362,403,452,453,567,570].

Στις ΗΠΑ καταγράφονται ετησίως 51.000 ψευδομοναδικές νοσοκομειακές λοιμώξεις (HAIs) , από τις οποίες το 13% οφείλονται σε στελέχη *P.aeruginosa* με πολυαντοχή (MDR) . Σύμφωνα με το CDC , το 19.3% των κλινικών στελεχών *P.aeruginosa* είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες [451,452]. Σύμφωνα με το ECDC, το 2016 στην Ευρώπη, ο μέσος όρος της αντοχή της ψευδομονάδας στις καρβαπενέμες αγγίζει το 15%. Η Ελλάδα καταλαμβάνει την τέταρτη θέση μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών με την αντοχή της *P.aeruginosa* στις καρβαπενέμες να βρίσκεται στο 42,1% .

Η αντοχή της *P.aeruginosa* στις καρβαπενέμες οφείλεται συνήθως : α) στη μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα λόγω της απώλειας των πορινών OprD β) στην υπερέκφραση των αντλιών εκροής MexAB-OprA , ενώ γ) τα τελευταία χρόνια παρατηρείται υψηλού επιπέδου αντοχή ως επι το πλείστον οφειλόμενη στην παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών (MBL).

Η πρώτη ανακάλυψη στελέχους *P.aeruginosa* που παρήγαγε μεταλλο-β-λακταμάση απομονώθηκε στην Ιαπωνία το 1988. Ονομάστηκε IMP-1 λόγω της αντοχής στην ιμιπενέμη [468]. Το 1997 στην Ιταλία απομονώθηκε για πρώτη φορά στέλεχος *P.aeruginosa* που παρήγαγε μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση, επρόκειτο για τη VIM-1 (Verona IMipenemase-1) [469]. Άλλα σπανιότερα ένζυμα της κατηγορίας των MBL που απομονώθηκαν σε στελέχη ψευδομονάδας είναι η SPM-1 (1999,Βραζιλία), η GIM-1 (2002,Γερμανία), η AIM-1 (2006,Αυστραλία), η FIM-1 (2007,Ιταλία) η HBM-1 (2012,Γερμανία). Οι τελευταίες αυτές MBL δεν έχουν ξεπεράσει τα όρια της χώρας όπου εντοπίστηκαν σε αντίθεση με τις IMP και κυρίως τις VIM που έχουν διασπαρεί παγκοσμίως σε στελέχη *P.aeruginosa* [470-474]. Όσον αφορά στη μεταλλο-β-λακταμάση NDM-1 , για πρώτη φορά εντοπίστηκε σε στέλεχος *P.aeruginosa* στη Σερβία το 2011 [475]. Μάλιστα αναγνωρίζεται ότι το γονίδιο *bla*_{NDM-1} στις ψευδομονάδες είναι ενδημικό στα βαλκάνια [476,477], ενώ στελέχη *P.aeruginosa* που παράγουν NDM έχουν έκτοτε απομονωθεί και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες καθώς και στην Ινδία και την Αίγυπτο [476-479] .Μελέτες έχουν δείξει ότι στελέχη *P. aeruginosa* που φέρουν *bla*_{VIM} και / ή *bla*_{NDM} εξαπλώνονται ταχέως στο νοσοκομειακό περιβάλλον, ενώ με μικρότερο επιπολασμό ακολουθούν τα στελέχη που εκφράζουν *bla*_{IMP}. Ειδικά, στην Ινδία, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός των MBLs στη *P. aeruginosa* κυμαίνεται από 14 έως 84%. Πολύ λίγες μελέτες έχουν αναφέρει τη συνύπαρξη των *bla*_{VIM} και *bla*_{NDM} στο ίδιο βακτήριο [477,479- 481] . Τα γονίδια *bla*_{OXA-48} και *bla*_{KPC} στην ψευδομονάδα εντοπιζονταν σποραδικά,όμως τα τελευταία χρόνια οι αναφορές αρχίζουν να πληθαίνουν . Πρώτη καταγραφή στελέχους ψευδομονάδας που παρήγαγε KPC έγινε στην Κολομβία το 2006 [482]. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν KPC-2 στο Πουέρτο Ρίκο, στο Τρινιντάντ και Τομπάγκο,στη Βραζιλία, στις ΗΠΑ και στην Κίνα , ενώ όλο και περισσότερο απομονώνονται στην Νότια Αμερική και στην περιοχή της Καραϊβικής, πλησιάζοντας τη συχνότητα απομονωσης στελεχων που παράγουν VIM [483]. Ταυτόχρονη παραγωγή KPC και MBL έχει αναφερθεί ελάχιστες φορές και έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα στη Νότια Αμερική [484,485]

Στην Ελλάδα ειδικότερα, οι συχνότερα απαντώμενες καραβαπενεμάσες σε στελέχη *P. aeruginosa* ανήκουν στην οικογένεια των VIM , με συχνότερες τις VIM-2 και

VIM-4 , ενώ έχουν καταγραφεί επιδημίες με VIM-17. Οι πρώτες αναφορές για την παραγωγή VIM σε ψευδομονάδα αφορούσαν σε επιδημία στη Θεσσαλονίκη το 1996 με στελέχη που παρήγαγαν VIM-1 [262]. Ακολούθησε η απομόνωση στελεχών *P.aeruginosa* που παρήγαγαν VIM-2, VIM- 4 και VIM-17, ενώ το 2013 απομονώθηκε για πρώτη φορά στέλεχος *P. aeruginosa* που παρήγαγε KPC [486-489].

Οι λοιμώξεις από στελέχη *P.aeruginosa* που εκφράζουν MBLs εμφανίζουν μεγαλύτερη νοσηρότητα και θνητότητα σε σχέση με λοιμώξεις από στελέχη που δεν παράγουν MBLs [260-264, 450-455].

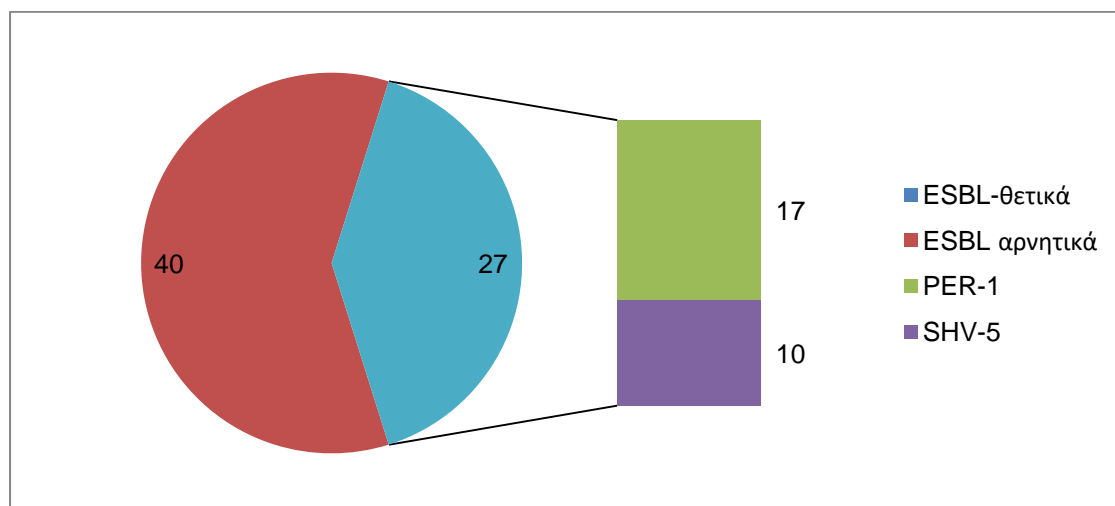
Μελέτες έχουν αναδείξει την ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και καρβαπενεμασών, κυρίως μεταλλο-β-λακταμασών σε στελέχη *P.aeruginosa* [492-495]. Για την επικράτηση στελεχών *P.aeruginosa* που παράγουν ταυτόχρονα ESBL και MBL υπεύθυνοι παράγοντες θεωρούνται η νοσηλεία σε ΜΕΘ, η παρουσία συννοσηροτήτων (χρόνια χρήση κορτικοστεροειδών, μεταμοσχευθέντες, νεοπλασίες συμπαγών οργάνων και αιματολογικές κακοήθειες, ουδετεροπενία) και κυρίως η προηγούμενη έκθεση του ασθενούς σε β-λακταμικά αντιβιοτικά [456 – 463, 567] .

Αξίζει να επισημανθεί ότι δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος για τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa* . Τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα φαινοτυπικά τεστ είναι αναξιόπιστα και υποεκτιμούν τη συχνότητα των ESBLs στην *P.aeruginosa*, καθώς εμπλέκεται η υπερπαραγωγή της ενδογενούς χρωμοσωμικής AmpC-β-λακταμάσης και η ταυτόχρονη παραγωγή καρβαπενεμασών. Αυτό συμβαίνει γιατί τόσο οι AmpCs όσο και οι καρβαπενεμάσες υδρολύουν τα υποστρώματα των φαινοτυπικών τεστ , ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, με συνέπεια να μην αποκαλύπτεται η ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs στα στελέχη *P.aeruginosa* .Οι ESBLs παραμένουν «κρυμμένες» [464,465,568].

Σκοπός του δεύτερου μέρους της διατριβής είναι να εφαρμόσουμε το προτυποποιημένο CLSI –ESBL τεστ και το Τροποποιημένο (modified CLSI ESBL test) σε στελέχη *P.aeruginosa* ,ώστε να τα συγκρίνουμε και να δούμε αν όντως η τροποποίηση με την προσθήκη βορονικού και EDTA βελτιώνει την απόδοση στην ανίχνευση ESBL σε στελέχη *P.aeruginosa*, όπως αντίστοιχα συνέβη στην περίπτωση των εντεροβακτηριακών (Α' μέρος διατριβής).

B.1. κατανομή των γονιδίων ESBLs στα εξεταζόμενα κλινικά στελέχη ψευδομονάδας

Ο μοριακός έλεγχος με PCR και νουκλεοτιδική αλληλούχιση έδειξε ότι μεταξύ των 67 στελεχών *P.aeruginosa*, τα 27 ήταν θετικά για την παραγωγή ESBL. Μεταξύ αυτών των 27 θετικών για ESBL στελεχών, τα 17 (62,97%) έφεραν PER-1 και τα υπόλοιπα 10 έφεραν τη SHV-5.



B.2 κατανομή των γονιδίων των άλλων τύπων β-λακταμασών

Όσον αφορά στην εγγενή παραγωγή AmpC-β-λακταμάσης, από το φαινοτυπικό και γονοτυπικό έλεγχο προέκυψε ότι 16 (23,9%) από τα 67 στελέχη *P.aeruginosa* ήταν υπερπαραγωγείς της AmpC-β-λακταμάσης (AmpC-hyperproducers). Συγκεκριμένα, AmpC-hyperproducers ήταν 7 (25,9%) από τα 27 ESBL-θετικά στελέχη και τα 12 (30%) από τα 40 ESBL-αρνητικά. Από τα 7 ESBL-θετικά στελέχη που ταυτόχρονα υπερπαραγωγή AmpC-β-λακταμάση, τα 4 εξέφραζαν την PER-1 και τα υπόλοιπα 3 εξέφραζαν ταυτόχρονα VIM-17 και SHV-5.

Όσον αφορά στην ταυτόχρονη παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών, από το φαινοτυπικό και γονοτυπικό έλεγχο προέκυψε ότι τα 10 στελέχη *P.aeruginosa* που εξέφραζαν την SHV-5, ταυτόχρονα εξέφραζαν καρβαπενεμάση VIM, και συγκεκριμένα, 7 (70%) SHV-θετικά στελέχη ταυτόχρονα παράγαν τη VIM-17, και τα υπόλοιπα 3 SHV-θετικά στελέχη ταυτόχρονα παράγαν τη VIM-2.

Από τα 40 αρνητικά για ESBL στελέχη, τα 25 (62,5%) παρήγαγαν ταυτόχρονα και μεταλλο-β-λακταμάσες τυπου VIM . Συγκεκριμένα, τα 17 (42,5%) ταυτόχρονα εξέφραζαν τη VIM-2, τα 5 (12,5%) εξέφραζαν τη VIM-17 και 3 ήταν παραγωγείς (7,5%) της VIM-4 . Τα υπόλοιπα 15 ESBL αρνητικά στελέχη δεν εξέφραζαν κάποια άλλη β-λακταμάση.

L-θετικά		ESBL-αρνητικά	
PER-1	13	VIM-2	17
PER-1+ AmpC	4	VIM-2	5
SHV-5 + VIM-17	4	VIM-4	3
SHV-5 + VIM-2	3	AmpC	12
SHV-5 + VIM-17 + AmpC	3	Non-ESBL -non AmpC	3
TOTAL	n=27		n=40

B.3 αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης

B.3.1. CLSI ESBL confirmatory test

Εφαρμόζοντας τη φαινοτυπική δοκιμασία που συστήνει το CLSI στα 67 συνολικά στελέχη *P.aeruginosa* , διαπιστώθηκε ότι σε 19 από τα 27 γονοτυπικά επιβεβαιωμένα για την παραγωγή ESBLs στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX/CA ή CAZ/CA ίση ή μεγαλύτερη των 5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CTX ή CAZ και η δοκιμασία θεωρήθηκε θετική για την παραγωγή ESBLs. Η ευαισθησία δηλαδή είναι 70,37 %.

Συγκεκριμένα , ανίχνευσε την παραγωγή ESBLs σε 4 από τα 10 στελέχη που ήταν παραγωγείς ταυτόχρονα MBLκαι ESBL (ευαισθησία 40%) και σε 15 από τα 17 στελέχη που παρήγαγαν PER-1 (ευαισθησία 88,24%). Μεταξύ των 40 ESBL-

αρνητικών , το CLSI ESBL test ανέδειξε 3 ψευδώς θετικά (ειδικότητα 92,5%). Αυτά τα 3 ψευδώς θετικά παρατηρήθηκαν σε στελέχη που δεν εξέφραζαν ούτε ESBL ούτε MBL.

Όπως είναι γνωστό, η *P.aeruginosa* παρουσιάζει εγγενή αντοχή στην κεφοταξίμη , που είναι το ένα από τα 2 υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες, οπότε είναι και αναμενόμενη η μικρή ή μηδενική ανάπτυξη ζωνών αναστολής γύρω από το δίσκο CTX. Μεταξύ των 15 επιβεβαιωμένων στελεχών που παράγουν PER-1, παρατηρήθηκε αύξηση ίση ή μεγαλύτερη των 5mm γύρω από τους δίσκους και των δύο αντιβιοτικών των συνδυασμένων με κλαβουλανικό σε ένα μόνο στελέχος , ενώ σημειώθηκε αύξηση μόνο γύρω από το δίσκο κεφταζιδίμης –κλαβουλανικού στα υπόλοιπα 14 . Μεταξύ των 4 στελεχών που είναι ταυτόχρονα SHV – VIM παραγωγείς, η αύξηση παρατηρήθηκε μόνο γύρω από το δίσκο κεφταζιδίμης – κλαβουλανικού.

B.3.2. Τροποποιημένο CLSI ESBL confirmatory test με προσθήκη PBA και EDTA

Εφαρμόζοντας στα 67 στελέχη της μελέτης την τροποποιημένη φαινοτυπική δοκιμασία, στην οποία προσθέσαμε 400μg φαινυλβορονικού(PBA) και 292μg EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών , διαπιστώθηκε ότι σε όλα γονοτυπικά επιβεβαιωμένα για την παραγωγή ESBLs στελέχη, παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ/CA/PBA/EDTA ή/και CTX/CA/PBA/EDTA κατά τουλάχιστον 5mm συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ/PBA/EDTA ή CTX /PBA/EDTA και η δοκιμασία θεωρήθηκε θετική για την παραγωγή ESBLs. Η ευαισθησία δηλαδή είναι 100%. Μεταξύ των 40 ESBL-αρνητικών , το τροποποιημένο CLSI ESBL test ήταν αρνητικό για όλα, δεν εμφάνισε δηλαδή ψευδώς θετικά και η ειδικότητα είναι 100%.

Μεταξύ των θετικών για PER-1 στελεχών , σε 4 (23,5%) στελέχη η αύξηση παρατηρήθηκε γύρω από τους δίσκους και των δύο αντιβιοτικών των συνδυασμένων με κλαβουλανικό , ενώ στα υπόλοιπα η αύξηση σημειώθηκε μόνο γύρω από το δίσκο κεφταζιδίμης –κλαβουλανικού. Μεταξύ των 10 θετικών για MBL

και SHV στελεχών , η αύξηση παρατηρήθηκε γύρω από τους δίσκους και των δύο αντιβιοτικών στα 8 στελέχη (80%) , ενώ στα υπόλοιπα δύο η αύξηση σημειώθηκε μόνο γύρω από το δίσκο κεφταζιδίμης .

ESBL screening method	No. (%) of isolates confirmed by PCR to be ESBL		Test performance (%)			
	Total ESBL-producing isolates (n=27)	Total non-ESBL-producing isolates (n=40)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CLSI ESBL confirmatory test ^a	19 (70.3)	3 (0)	70.3	92.5	86.4	82.2
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^b	27 (100)	0 (0)	100	100	100	100
	ESBL only-producing isolates (n=17)	non-ESBL-producing isolates (n=15)				
CLSI ESBL confirmatory test ^a	15 (88.2)	0 (0)	88.2	100	100	88.2
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^b	17 (100)	0 (0)	100	100	100	100
	MBL/ESBL-producing isolates (n=10)	MBL-positive non-ESBL-producing isolates (n=25)				
CLSI ESBL confirmatory test ^a	4 (40)	3 (0)	40	88	57.1	78.6
Modified CLSI ESBL confirmatory test ^b	10 (100)	0 (0)	100	100	100	100

^aCTX-CA vs CTX and/or CAZ-CA vs CAZ; ^bCTX-CA-BA-EDTA vs CTX-BA-EDTA and/or CAZ-CA-BA-EDTA vs CAZ-BA-EDTA

CLSI –ESBL τεστ

τροποποιημένο CLSI –ESBL τεστ

γονότυπος	CAZ	CTX	CAZ+CTX		CAZ	CTX	CAZ+ CTX
PER-1 (n=17)	14	-	1		13	-	4
SHV+ VIM (n=10)	4	-	-		2	-	8
Total	18	0	1		15	0	12
Επιβεβαιωμένα			19 / 27				27 / 27

πίνακας 1: κατανομή των θετικών αποτελεσμάτων ανά δοκιμασία, με βάση το είδος του αντιβιοτικού

B.3.3 Αυξήσεις στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής

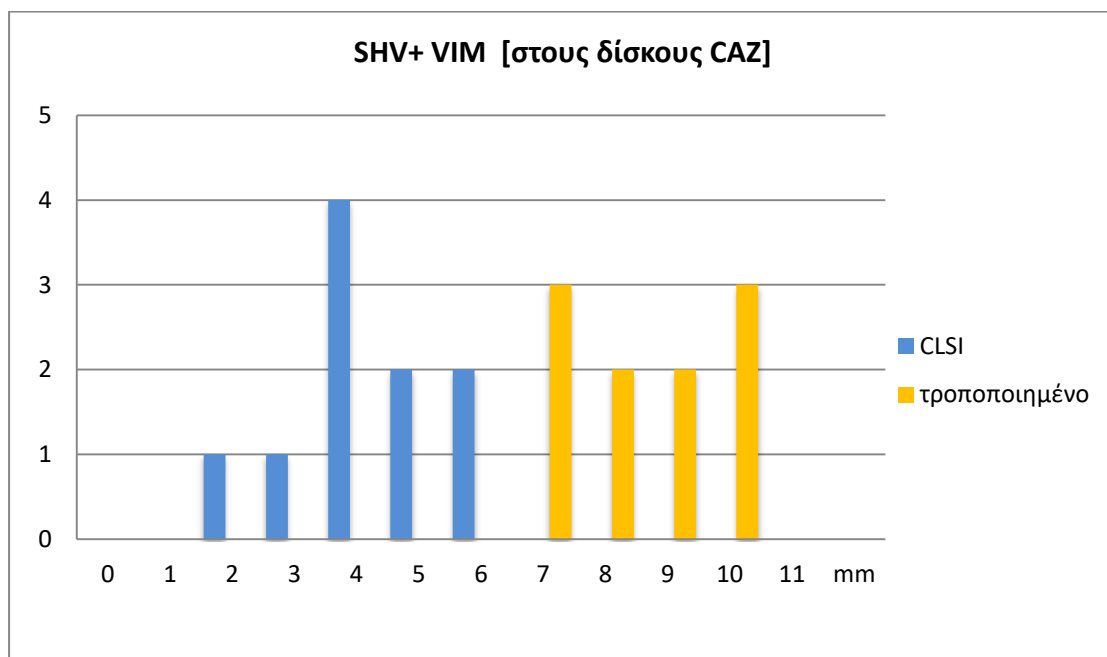
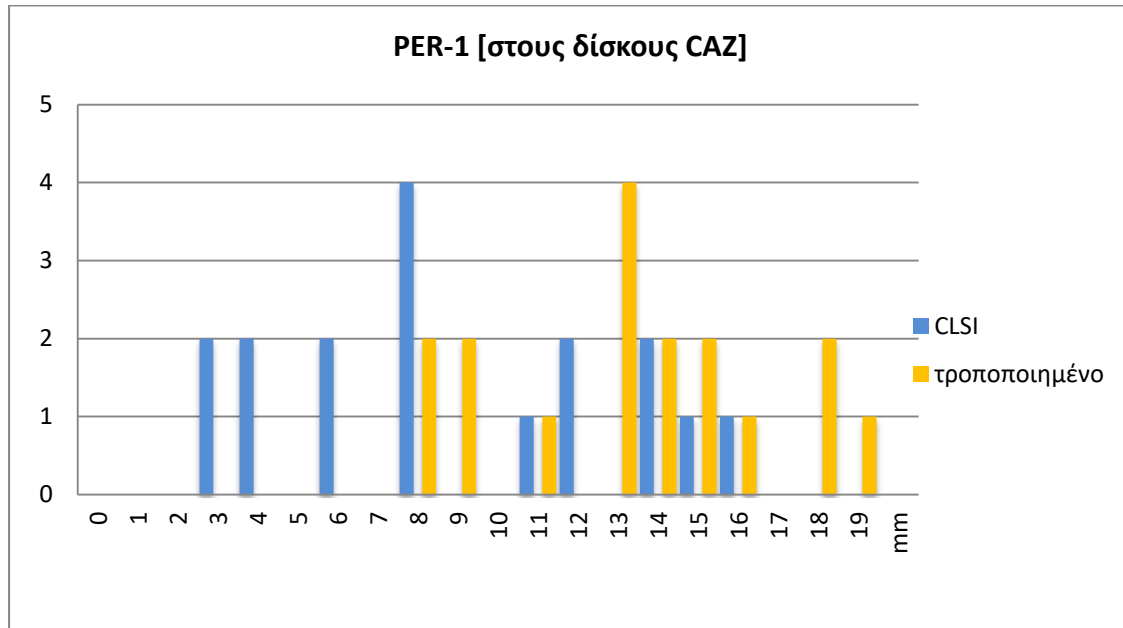
Όπως είναι γνωστό, η *P.aeruginosa* παρουσιάζει εγγενή αντοχή στην κεφοταξίμη , που είναι το ένα από τα 2 υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες, οπότε είναι και αναμενόμενη η μικρή ή μηδενική ανάπτυξη ζωνών αναστολής γύρω από το δίσκο CTX.

Μεταξύ των ESBLs - θετικών στελεχών, το τροποποιημένο τεστ κατάφερε να ενισχύσει σημαντικά την αύξηση στη διάμετρο των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους αντιβιοτικών. Αυτό ήταν ιδιαίτερα εμφανές μεταξύ των στελεχών που ταυτόχρονα παρήγαγαν VIM και ESBL. Στα στελέχη αυτά, η ενίσχυση της αύξησης της διαμέτρου της ζώνης αναστολής ήταν μεγαλύτερη καθώς αυτά εξέφραζαν SHV-ESBLs. Η κεφταζιδίμη θεωρείται από τα καλύτερα υποστρώματα για τις SHV-ESBLs και ειδικότερα για τη SHV-5 .

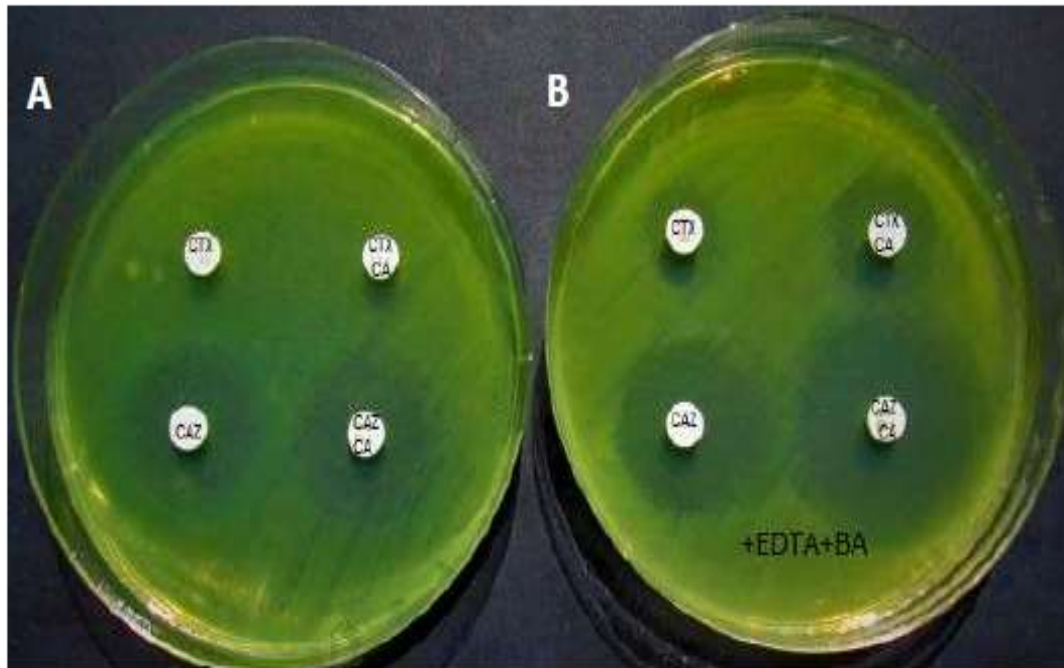
Στον πίνακα ,παρουσιάζονται ανά φαινοτυπική δοκιμασία (CLSI-ESBL test και τροποποιημένο) , οι μέσες διαφορές σε mm στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής στα εξεταζόμενα ESBL-θετικά κλινικά στελέχη.

γονότυποι στελεχών	μέσες αυξήσεις (σε mm) στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής			
	CLSI ESBL confirmatory test		τροποποιημένο τεστ	
	CAZ-CA/ CAZ	CTX-CA/ CTX	CAZ-CA-BA-EDTA/ CAZ-BA-EDTA	CTX-CA-BA-EDTA/ CTX-BA-EDTA
PER-1 producers (n=13)	10,5	1,1	13,3	3,52
PER-1 /AmpC prod.(n=4)	7	0	13,25	8,2
SHV-5 + VIM (n=7)	4,4	0	8,4	5,14
SHV+VIM+AmpC (n=3)	4,0	0	10,0	5,7

Στα κάτωθι διαγράμματα αποτυπώνονται ανά κατηγορία ESB-θετικών στελεχών η κατανομή των αυξήσεων στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ/CA συγκριτικά με τη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ στο CLSI –ESBL test και στο τροποποιημένο με προσθήκη PBA και EDTA τεστ. Αύξηση ίση ή μεγαλύτερη των 5mm θετικοποιεί το τεστ.



Παρατηρούμε ότι το τροποποιημένο τεστ (κίτρινο χρώμα) ενίσχυσε σημαντικά την αύξηση στη ζώνη αναστολής υποδηλώνοντας τη ανασταλτική δράση του συνδυασμού του βορονικού και του EDTA εναντίον της δράσης των μεταλλο-β-λακταμασών και των AmpCs, οδηγώντας στην αποκάλυψη των κρυμμένων ESBLs.



Φαινοτυπική ανίχνευση ESBL σε στέλεχος *P.aeruginosa* που παράγει ταυτόχρονα VIM-2 και SHV-5 εφαρμόζοντας Α) το CLSI ESBL test και Β) το τροποποιημένο τεστ με την προσθήκη PBA και EDTA (modified CLSI ESBL test) ,στο οποίο αποτυπώνεται η αύξηση των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους και των 2 υποστρωμάτων

3. Συζήτηση

Το 1967 , την χρυσή εποχή των αντιβιοτικών, ο William Stewart, ο Γενικός Χειρουργός των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής , επιχειρησιακός επικεφαλής και κύριος εκπρόσωπος σε θέματα Δημόσιας Υγείας έκανε την εξής δήλωση : *«Έχει έρθει η ώρα να κλείσουμε το βιβλίο για τα λοιμώδη νοσήματα. Έχουμε ουσιαστικά αφανίσει τις λοιμώξεις στις Ηνωμένες Πολιτείες»*. Είναι μια δήλωση που αντανακλούσε τη γενικότερη αισιοδοξία της επιστημονικής κοινότητας την εποχή εκείνη, όσον αφορά στην καταπολέμηση των λοιμώξεων. Ακριβώς 50 χρόνια μετά, η ανθρωπότητα βρίσκεται μπροστά στον κίνδυνο να μεταπέσει σε μια «μετά-αντιβιοτική εποχή» (post antibiotic era), όπου τα ανθεκτικά μικρόβια δεν θα καταπολεμώνται από τα διαθέσιμα αντιβιοτικά, με ορατές τις δυσμενείς συνέπειες στη νοσηρότητα και θνησιμότητα των λοιμώξεων, ενώ πολλά από τα επιτεύγματα της σύγχρονης ιατρικής θα βρίσκονται υπό διακινδύνευση. Υπολογίζεται ότι στις μέρες μας , 2 εκατομμύρια άνθρωποι στις ΗΠΑ νοσούν από ανθεκτικά βακτήρια με 23.000 άμεσους θανάτους ετησίως και αντίστοιχα στην Ευρώπη , περίπου 3 εκατομμύρια άνθρωποι με 25.000 άμεσους θανάτους [19-27].

Η συχνότητα των λοιμώξεων από ανθεκτικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι αυξανόμενη τόσο όσον αφορά στις λοιμώξεις τις σχετιζόμενες με χώρους παροχής υγείας όσο και στις λοιμώξεις κοινότητας . Μάλιστα, σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές, όπως στην Ν.Α. Ασία και την Κίνα η συχνότητα απομόνωσης ανθεκτικών gram-αρνητικών βακτηρίων από την κοινότητα είναι παραπλήσια εκείνης των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Από επιδημιολογική άποψη, υπάρχουν χώρες με ενδημία ,ακόμη και υπερενδημία, ανθεκτικών gram-αρνητικών .Η κατάχρηση των αντιβιοτικών στους ανθρώπους και τη ζωοτροφία, οι κακές υγειονομικές συνθήκες και τα ελλιπή μέτρα ελέγχου λοιμώξεων, η φαρμακευτική ρύπανση και οι μετακινήσεις πληθυσμών και αγαθών επιτείνουν τη διασπορά των ανθεκτικών gram-αρνητικών [194-200,214].

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν τη θεμέλιο λίθο στη θεραπευτική των λοιμώξεων. Οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες ,οι μονοβακτάμες και οι καρβαπενέμες αποτελούν τις τέσσερις κατηγορίες των β- λακταμικών. Είναι τα πλέον

συνταγογραφούμενα αντιμικροβιακά ,πρώτα στους ανθρώπους και δεύτερα στην κτηνιατρική. Αποτελούν την πρώτη επιλογή στην εμπειρική αγωγή. Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στο ότι είναι βακτηριοκτόνα φάρμακα με ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα μεταξύ των gram θετικών και αρνητικών, έχουν καλή φαρμακοκινητική, λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες και γίνονται καλύτερα ανεκτά απ' ο,τι εναλλακτικά αντιβιοτικά , όπως πχ πολυμιξίνες ή τιγκεκυκλίνη, έχουν χαμηλή τιμή και μεγάλη διαθεσιμότητα εντός και εκτός νοσοκομείου παγκοσμίως.

Τα gram- αρνητικά βακτήρια, όμως , είναι ένας πολυποίκιλος και προσαρμόσιμος πληθυσμός, που ανέπτυξε μηχανισμούς αμύνης στα β-λακταμικά αντιβιοτικά , με προεξάρχουσα την παραγωγή των β-λακταμασών, ενζύμων που υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο. Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των β-λακταμασών και σε αντίθεση με τα gram-θετικά , όπου ο αριθμός των υπεύθυνων γονιδίων αντοχής είναι περιορισμένος , όπως πχ 2 γονίδια (*mecA* και *mecC*) για τον MRSA , στην περίπτωση των β-λακταμασών τα γονίδια είναι περισσότερα από 1000 [312].

Στην προσπάθεια της ιατρικής να υπερκεράσει το πρόβλημα της αντοχής λόγω των β-λακταμασών, άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως από το 1980 οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς. Λίγα χρόνια μετά , μόλις το 1983 , στη Γερμανία απομονώθηκε ένα στέλεχος *Klebsiella spp* ανθεκτικό στις κεφαλοσπορίνες γ'γενεάς. Και τότε σε αυτό ανακαλύφθηκε μια νέα β-λακταμάση που είχε ευρύτερο υδρολυτικό φάσμα [313]. Σύντομα ανακαλύφθηκαν και άλλες παρόμοιας δράσης β-λακταμάσες. Αυτές οι πρώτες διευρυμένου φάσματος β-λακταμάσες ήταν παράγωγα των αρχικών β-λακταμασών TEM-1,TEM-2 και SHV-1 και προέκυπταν μέσω σημειακών μεταλλάξεων. Ονομάστηκαν β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (extended spectrum beta lactamases , ESBLs).

Οι ESBLs υπερβαίνουν σε αριθμό τις 500. Είναι εξαιρετικά διαδομένες σε στελέχη εντεροβακτηριακών , και κυρίως στα *K.pneumoniae* και *E.coli* , αλλά απαντώνται και σε στελέχη αζυμωτικών , όπως *A.baumannii* και *P.aeruginosa* [295,314, 315,319]. Οι επικρατέστεροι, αριθμητικά και γεωγραφικά, τύποι είναι οι SHV-ESBLs, TEM-ESBLs ,OXA-ESBLs και CTX-Ms, ενώ λιγότερο συχνές είναι οι PER, VEB, BEL, TLA, GES, SFO-1, BES-1 [281-285,289]. Οι CTX-Ms ειδικότερα , άρχισαν να κυριαρχούν από τις αρχές του 2000 ,σχεδόν εκτοπίζοντας τους άλλους τύπους, με επικρατούσα την

CTX-M-15 ,της οποίας η επιτυχημένη παγκόσμια διασπορά έχει συνδεθεί με τον κλώνο *E.coli* ST131 [338,346] .

Οι ESBLs αδρανοποιούν τελικά τις πενικιλίνες , τις κεφαλοσπορίνες δεύτερης και τρίτης γενιάς και την αζτρεονάμη, αντιβιοτικά που μέχρι τότε συνιστούσαν τη θεραπεία πρώτης γραμμής για τα Gram-αρνητικά. Ένας άλλος σημαντικός λόγος που καθιστά την παραγωγή των ESBLs σοβαρό πρόβλημα είναι ότι τα γονίδια τους εντοπίζονται σε μεταθετά στοιχεία αυξημένης κινητικότητας (πλασμίδια, τρανσποζόνια) που επίσης μεταφέρουν γονίδια αντοχής σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών, όπως τις αμινογλυκοσίδες, τη σουλφομεθοξαζόλη ή και τις κινολόνες. Το γεγονός αυτό είναι μείζονος σημασίας γιατί έχει οδηγήσει όχι μόνο στην ευρεία οριζόντια διασπορά των γονιδίων αντοχής, αλλά και στη δυσχερή αντιμετώπιση των λοιμώξεων καθώς περιορίζονται οι θεραπευτικές επιλογές [196,436].

Η παραγωγή ESBLs οδηγεί σε θεραπευτική αστοχία και περιορίζει τις θεραπευτικές επιλογές συντελώντας σε παράταση νοσηλείας και σε μεγαλύτερη οικονομική επιβάρυνση και κυρίως σε αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας [431-433]. Συγκεκριμένα , μετανάλυση έδειξε ότι είναι σχεδόν διπλάσιος ο σχετικός κίνδυνος (1,85 RR) να πεθάνουν ασθενείς με βακτηριαιμία από ESBLs –θετικά εντεροβακτηριακά σε σχέση με ασθενείς που έχουν βακτηριαιμία από εντεροβακτηριακά που δεν παράγουν ESBLs [434].

Για όλους αυτούς τους λόγους, επομένως, υπάρχει η ανάγκη της αποτελεσματικής ανίχνευσής τους ώστε να γίνει κατάλληλη επιλογή της θεραπευτικής αγωγής και να εφαρμοστούν έγκαιρα τα μέτρα ελέγχου της διασποράς. Το CLSI προτείνει μια φαινοτυπική δοκιμασία επιβεβαίωσης της παραγωγής των ESBLs (το CLSI ESBL Confirmatory Test, 2000) σε στελέχη εντεροβακτηριακών που κατά την αρχική διαλογή (screening) εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία σε κεφαλοσπορίνες-δείκτες, όπως είναι η κεφποδοξίμη, η κεφτριαξόνη ,η κεφτιζοξίμη κα .

Η συγκεκριμένη δοκιμασία φαινοτυπικής επιβεβαίωσης είναι προτυποποιημένη για στελέχη *E.coli*, *Klebsiella* spp και *P.mirabilis* . Πρόκειται για δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (Combined Disk Test ,CDT) ,στην οποία χρησιμοποιούνται δίσκοι κεφταζιδίμης και κεφοταξίμης 30μg χωρίς ή με κλαβουλανικό 10μg. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόζεται σε στελέχη εντεροβακτηριακών που φέρουν AmpC-β-λακταμάση ή καρβαπενεμάσες [377,378].

Η αυξανόμενη συχνότητα απομόνωσης στελεχών που παράγουν ESBLs οδήγησε στην ευρεία χρήση των καρβαπενεμών. Αυτό είχε ως συνέπεια να ασκηθεί πίεση επιλογής και να προκύψουν βακτηριακά στελέχη που εκτός από ESBLs παράγουν ταυτόχρονα και καρβαπενεμάσες. Επίσης, ESBLs παράγουν αρκετά συχνά και στελέχη που εκφράζουν παράλληλα πλασμιδιακές AmpC-β-λακταμάσες ή χρωμοσωμικές AmpCs, μετά από αποκαταστολή (derepressed AmpCs) ή επαγωγή (inducible AmpCs). Οι AmpC-β-λακταμάσες είναι και αυτές ένζυμα που υδρολύουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος. Όπως έχει ειπωθεί, τα γονίδια των ESBLs εντοπίζονται αρκετά συχνά σε μεταθετά γενετικά στοιχεία αυξημένης κινητικότητας, τα οποία επίσης μπορεί να φέρουν γονίδια πλασμιδιακών AmpCs ή καρβαπενεμασών, οπότε είναι δυνατή η συμμεταφορά τους και η ευρεία οριζόντια διασπορά τους.

Όπως γίνεται αντιληπτό, το φαινοτυπικό CLSI ESB� Confirmatory Test δεν επιτρέπει την ανίχνευση των ESBLs, όταν ταυτόχρονα παράγονται καρβαπενεμάσες ή AmpC-β-λακταμάσες, καθώς υδρολύουν τα υποστρώματα των αντιβιοτικών (CAZ, CTX), που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία αυτή, ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ [377,381-386]. Η παρουσία των άλλων τύπων β-λακταμασών δυσχεραίνει τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs καλύπτοντας την παραγωγή τους. Οι ESBLs δεν ανιχνεύονται και παραμένουν «κρυμμένες». Η συχνότητά τους υποεκτιμάται. Για τους λόγους αυτούς, κρίνεται αναγκαίο να προσαρμοστεί το CLSI ESB� Test στα νέα δεδομένα αντοχής.

Η ακριβής φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs παρά την ταυτόχρονη παραγωγή άλλων τύπων β-λακταμασών κρίνεται απαραίτητη όχι μόνο για τη συγκέντρωση των επιδημιολογικών δεδομένων και το σχεδιασμό αντιμικροβιακής στρατηγικής, αλλά και για την άμεση εφαρμογή των μέτρων ελέγχου λοιμώξεων [437]. Επίσης, η αξιόπιστη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs μπορεί να φανεί χρήσιμη στην καθοδήγηση της θεραπείας. Απουσία των ESBLs, παρά την ταυτόχρονη παραγωγή άλλων β-λακταμασών, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να επιτρέψει την αποκλιμάκωση από τις καρβαπενέμες.

Στην παρούσα μελέτη, επιβεβαίωσαμε ότι όντως το CLSI ESBL Confirmatory Test δεν μπορεί να εντοπίσει με ακρίβεια την παραγωγή των ESBLs όταν ταυτόχρονα παράγονται κι άλλοι τύποι β-λακταμασών. Οι ESBLs παραμένουν «κρυμμένες» και η συχνότητά τους υποεκτιμάται. Προσπαθήσαμε με τροποποιήσεις να βελτιώσουμε την απόδοση του CLSI ESBL Confirmatory Test στην ανίχνευση των ESBLs ακόμη και όταν ταυτόχρονα παράγονται AmpCs ή καρβαπενεμάσες. Προχωρήσαμε στην τροποποίηση της μεθόδου CLSI ESBL Test προσθέτοντας βορονικό οξύ και EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών , προκειμένου να αποκαλυφθούν οι «κρυμμένες» ESBLs. Τόσο το προτυποποιημένο τεστ (CLSI ESBL Confirmatory Test) όσο και η τροποποιημένη μέθοδος (modified CLSI test) εφαρμόστηκαν σε θετικά και αρνητικά για την παραγωγή ESBLs στελέχη, 368 στο σύνολο.

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI Test) συνίσταται στη σύγχρονη εφαρμογή στους δίσκους των αντιβιοτικών 10 μl διαλύματος βορονικού οξέος συγκέντρωσης 40mg/ml , που περιέχει 400μg βορονικού οξέος , και 10 μl διαλύματος EDTA 0,1M , που περιέχει 292 μg EDTA. Το βορονικό οξύ είναι αναστρέψιμος αναστολέας των KPC καρβαπενεμασών και των AmpC-β- λακταμασών και η χρήση του σε φαινοτυπικές δοκιμασίες είχε οδηγήσει στην αποκάλυψη ESBLs σε στελέχη εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παράγουν AmpCs ή KPC-καρβαπενεμάσες [380-386,446]. Το EDTA είναι χηλικός υποκαταστάτης που αναστέλλει τις μέταλλο-β-λακταμάσες δεσμεύοντας τα ιόντα ψευδαργύρου που είναι απαραίτητα για τη δράση τους [382-386,435,444-446].

Βασιστήκαμε στην υπόθεση ότι οι δύο αυτοί αναστολείς , βορονικό και EDTA, θα ασκούσαν την ανασταλτική δράση τους, στις συνυπάρχουσες καρβαπενεμάσες και AmpC-β-λακταμάσες , και αυτό θα αποτυπώνονταν στην ενίσχυση της αύξησης της διαμέτρου των ζωνών αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ/CA και CTX/CA συγκριτικά με τις ζώνες αναστολής γύρω από τους δίσκους CAZ και CTX αντίστοιχα , αποκαλύπτοντας την υποκείμενη κεκαλυμμένη παραγωγή των ESBLs.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής , μελετήσαμε 301 στελέχη εντεροβακτηριακών, ενώ στο δεύτερο μέρος μελετήσαμε 67 στελέχη *P.aeruginosa* θέλοντας να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) μπορεί

να ανιχνεύει με ακρίβεια την παραγωγή ESBLs και εκτός των εντεροβακτηριακών , συγκεκριμένα σε στελέχη *P.aeruginosa*.

Τα εντεροβακτηριακά και η *P.aeruginosa* είναι τα συχνότερα απομονωθέντα κλινικά στελέχη. Αποτελούν συνήθη αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων ,αλλά και λοιμώξεων κοινότητας, ενώ καταλαμβάνουν τις υψηλότερες θέσεις στην εμφάνιση αντοχής. Γιαυτό και συνιστούν σοβαρές απειλές δημόσιας υγείας παγκόσμια , όπως φαίνεται από καταγραφές των οργανισμών WHO και CDC καθώς και άλλων διεθνών και εθνικών οργανισμών δημόσιας υγείας[4,8,19,427,467].

Α' μέρος διατριβής - εντεροβακτηριακά: Το CLSI ESBL Confirmatory Test δεν μπόρεσε να εντοπίσει την παραγωγή των ESBLs στην πλειονότητα των εξεταζόμενων ESBL-θετικών εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παράγουν MBL ή συνδυασμό KPC-καρβαπενεμάσης και MBL . Το CLSI ESBL Confirmatory Test εντόπισε την παραγωγή ESBLs μοναχά σε 4 από τα 40 εντεροβακτηριακά που εμφάνιζαν ταυτόχρονη παραγωγή MBL μόνη της ή σε συνδυασμό με KPC-καρβαπενεμάση. Συγκεκριμένα, θετικοποιήθηκε σε 4 από τα 30 MBL-producers (ευαισθησία 13,3%) και σε κανένα από τα 10 στελέχη MBL/KPC-producers (ευαισθησία 0,0%). Παρομοίως, δεν είχε υψηλή ευαισθησία , όταν δοκιμάστηκε σε ESBL-θετικά στελέχη που ταυτόχρονα παράγουν KPC ή AmpC (πλασμιδιακή ή υπερπαραγωγή χρωμοσωμικής). Συγκεκριμένα, το CLSI test εντόπισε την παραγωγή ESBLs σε 23 από τα 35 στελέχη που ταυτόχρονα παράγουν KPC (ευαισθησία 65,7%) και σε 18 από τα 25 στελέχη που ταυτόχρονα παράγουν AmpC-β-λακταμάσες (ευαισθησία 72%) .

Όπως είναι αναμενόμενο , το CLSI ESBL Confirmatory Test ήταν ακριβές στην ανίχνευση των ESBLs στα εντεροβακτηριακά εκείνα που δεν παράγουν ταυτόχρονα άλλο τύπο β-λακταμασών (ευαισθησία 98,1%) .

Συμπεράναμε ότι το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) ήταν ακριβές στην ανίχνευση των ESBLs ανεξαρτήτως της παρουσίας καρβαπενεμασών και AmpC- β-λακταμασών. Μπόρεσε να ανιχνεύσει σχεδόν όλα τα γονοτυπικά επιβεβαιωμένα για την παραγωγή ESBLs στελέχη εντεροβακτηριακών (158 από το σύνολο των 162, ευαισθησία 97,5%), σε αντίθεση με το CLSI ESBL Test , που ανίχνευσε λιγότερα (106 από τα 162, ευαισθησία 65,4%).

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) αποκάλυψε την παραγωγή των «κρυμμένων» ESBLs σχεδόν σε όλα τα εντεροβακτηριακά που ταυτόχρονα παράγουν καρβαπενεμάσες ή AmpC-β-λακταμάσες (106 από τα 108, ευαισθησία 98,1%). Αντιθέτως, το CLSI ESBL Test δεν κατάφερε να αποκαλύψει την παραγωγή των «κρυμμένων» ESBLs σε 55 από τα 108 στελέχη που εκτός από ESBLs, ταυτόχρονα παράγουν καρβαπενεμάσες ή AmpCs (ευαισθησία 49,1%).

Πιο συγκεκριμένα, το τροποποιημένο φαινοτυπικό τεστ (modified CLSI test) ανίχνευσε την παραγωγή ESBLs σε όλα τα στελέχη εντεροβακτηριακών που ταυτόχρονα παράγουν σερινοκαρβαπενεμάση (KPC ή OXA-48) και AmpC-β-λακταμάση (πλασμιδιακή ή υπερπαραγωγή χρωμοσωμικής) (ευαισθησία 100%). Μεταξύ των ESBL-θετικών εντεροβακτηριακών που επιπλέον παράγουν μεταλλο-β-λακταμάση, το τροποποιημένο τεστ εντόπισε την παραγωγή ESBL σε 29 από τα 30 στελέχη (ευαισθησία 96,7%). Όσον αφορά στα 10 στελέχη, που ταυτόχρονα παράγουν KPC και VIM, το τροποποιημένο τεστ αναγνώρισε την παραγωγή ESBLs σε 9 από αυτά (ευαισθησία 90,0%).

Επίσης, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) ανίχνευσε την πλειονότητα των στελεχών που παράγουν αποκλειστικά ESBLs, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των στελεχών που ήταν ανθεκτικά στην ερταπενέμη λόγω του συνδυαστικού μηχανισμού αντοχής τους, δηλαδή της παραγωγής ESBLs και της απώλειας πορινών. Ως προς την κατηγορία αυτή των στελεχών είχε συγκρίσιμα αποτελέσματα με το CLSI ESBL Test και δεν επέδειξε κατωτερότητα.

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) δεν έδωσε κανένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (ειδικότητα 100%), σε αντίθεση με το προτυποποιημένο CLSI ESBL Confirmatory Test που θετικοποιήθηκε σε 4 γονοτυπικά αρνητικά για ESBLs στελέχη εντεροβακτηριακών (ειδικότητα 97,1%).

Β' μέρος διατριβής - *P.aeruginosa*: Θελήσαμε να επεκτείνουμε την εφαρμογή του CLSI ESBL test και της τροποποιημένης μεθόδου (modified CLSI ESBL test) εκτός των επίσημων συστάσεων του CLSI, και ειδικότερα σε στελέχη *P.aeruginosa*. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν συχνά παθογόνα, έχουν εγγενή αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και έχουν αποκτήσει πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής, συμπερι-

λαμβανομένων των ESBLs και των καρβαπενεμασών. Τόσο η παραγωγή των ESBLs όσο και η παραγωγή των καρβαπενεμασών ανοίγουν νέο κεφάλαιο στην αντοχή της *P.aeruginosa*. Οι ESBLs περιγράφονται με ολόένα και μεγαλύτερη συχνότητα σε στελέχη *P.aeruginosa*. Η οικογένεια των PER είναι αυτή που απαντάται συχνότερα, ενώ έχουν εντοπιστεί και άλλοι τύποι ESBLs, όπως πχ VEB, TEM, SHV, CTX-M [345, 357,358,362,403,452,453,567,570]. Υπάρχουν, όμως, και μελέτες που περιγράφουν την ταυτόχρονη παραγωγή ESBLs και καρβαπενεμασών, συχνότερα του τύπου MBL [492-495,570].

Η φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa* αποτελεί πρόκληση για τον κλινικό μικροβιολόγο, καθώς δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος και τα μέχρι τώρα διαθέσιμα φαινοτυπικά τεστ υποεκτιμούν την παραγωγή ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa* [461-463,567].

Το CLSI ESBL Test δεν μπόρεσε να εντοπίσει την παραγωγή των ESBLs στην πλειονότητα των εξεταζόμενων ESBL-θετικών στελεχών *P.aeruginosa*, που ταυτόχρονα παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες (MBL). Εντόπισε την παραγωγή ESBLs σε 4 από τα 10 εξεταζόμενα στελέχη (ευαισθησία 40,0%). Αντιθέτως, η τροποποιημένη μέθοδος (modified CLSI test) με τη σύγχρονη προσθήκη των αναστολέων (βορονικό και EDTA) αποκάλυψε την παραγωγή των «κρυμμένων» ESBLs σε όλα τα στελέχη *P.aeruginosa*, που ταυτόχρονα παράγουν MBL (ευαισθησία 100%). Επίσης, μεταξύ των στελεχών που παράγουν αποκλειστικά ESBL (ESBL-producers), το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) ανίχνευσε την παραγωγή PER-1 σε όλα τα στελέχη *P.aeruginosa* (ευαισθησία 100%), ενώ το CLSI ESBL Test σε 15 από τα 17 εξεταζόμενα στελέχη (ευαισθησία 88,2%).

Λόγω της ανασταλτικής δράσης του συνδυασμού βορονικού και EDTA, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες διάμετροι στη ζώνη αναστολής γύρω από τους δίσκους των αντιβιοτικών και η ενίσχυση αυτή διευκόλυνε την πιο εύκολη και άμεση ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Δηλαδή, στην περίπτωση των θετικών αποτελεσμάτων, οι διαφορές στις διαμέτρους των ζωνών αναστολής ήταν μεγαλύτερες, πολύ πιο πάνω από το όριο των 5mm, συντελώντας στην πιο ευκρινή διάκριση των θετικών στελεχών, ακόμη και με το μάτι.

Σύμφωνα με τη μελέτη μας , η τροποποίηση του CLSI ESBL Confirmatory Test με την προσθήκη βορονικού και EDTA οδήγησε σε βελτίωση της ευαισθησίας (sensitivity) , της ειδικότητας (specificity) , της θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας (positive and negative predictive value) , καθώς αποκάλυψε την παραγωγή ESBLs , ακόμα και σε στελέχη στα οποία αυτή παρέμενε «κρυμμένη» κάτω από τη δράση των καρβαπενεμασών ή των AmpC- β-λακταμασών, ενζύμων που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό και που επίσης υδρολύουν την κεφτοταξίμη και την κεφταζιδίμη, τις κεφαλοσπορίνες δηλαδή που χρησιμοποιούνται στη φαινοτυπική αυτή δοκιμασία.

Μπορεί οι μοριακές τεχνικές να παρέχουν ακριβή και άμεσα αποτελέσματα στην ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής ,να αποτελούν το «χρυσό πρότυπο» (gold standard), όμως η εφαρμογή τους είναι ακόμα περιορισμένη. Οι περισσότερες μοριακές τεχνικές είναι ακόμα υψηλού οικονομικού κόστους και απαιτούν εμπειρία και επιδεξιότητα.

Επιπλέον, ως προς την εντόπιση των ESBLs, δεν υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα αυτοματοποιημένα συστήματα. Τα περισσότερα εξ αυτών έχουν εστιάσει στην ανίχνευση των καρβαπενεμασών. Ακόμη και όταν στα πάνελ τους περιλαμβάνουν ESBLs, συνήθως αφορούν λίγους τύπους αυτών, οπότε και πάλι διαφεύγουν χρήσιμα επιδημιολογικά δεδομένα.

Επιπροσθέτως , με τις τεχνικές PCRs δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε νέες ή μεταλλαγμένες β-λακταμάσες, συμπεριλαμβανομένων των ESBLs, παρά στοχεύουμε σε ήδη γνωστά γονίδια. Την υποψία νέων ή μεταλλαγμένων ESBLs μάς την θέτει η φαινοτυπική δοκιμασία, οπότε με το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) ενισχύεται η δυνατότητά μας αυτή και προσανατολίζεται περαιτέρω η έρευνα. Επιπλέον, με τις τεχνικές PCRs δεν μπορούμε να διαπιστώσουμε αν ένα γονίδιο αντοχής όντως εκφράζεται. Με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες και πολύ περισσότερο με το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) διαπιστώνουμε την ενζυμική δραστηριότητα συνυπαρχόντων γονιδίων.

Εκτός από τους επιδημιολογικούς σκοπούς, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) θα μπορούσε να έχει εφαρμογή και στη θεραπευτική. Η αυξημένη

ευαισθησία του (> 97,5%) και ειδικότητά του (100%) μπορεί να συμβάλλει στην ασφαλή αποκλιμάκωση της θεραπείας λοιμώξεων οφειλόμενων σε εντεροβακτηριακά που φέρουν AmpCs, OXA-48 ή MBL, καθώς η απουσία των ESBLs σε αυτά τα παθογόνα μπορεί να επιτρέψει τη χρήση κεφεπίμης, οξυ-ιμινο-κεφαλοσπορινών και αζτρεονάμης αντιστοίχως. Προσφάτως έχουν εισαχθεί στην κλινική πράξη νέοι συνδυασμοί β-λακταμικών με αναστολείς και η δραστηριότητα τους ενδεχομένως να επηρεαστεί από την παραγωγή ESBLs, γιαυτό κρίνεται απαραίτητη η στενή επιδημιολογική επιτήρηση [195,219,437-438,466].

Μία άλλη πρακτική εφαρμογή του τροποποιημένου τεστ (modified CLSI ESBL test) θα μπορούσε να είναι η επέκταση του έλεγχου για φορεία. Έχουν υπάρξει αναφορές ότι η φορεία με στελέχη gram -αρνητικών που παράγουν ESBLs, και ειδικότερα εντεροβακτηριακών και *P.aeruginosa*, μπορεί να ανιχνεύεται για παρατεταμένο διάστημα (από μερικούς μήνες ως και 2 έτη). Η φορεία θεωρείται παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση λοίμωξης, αλλά και διασποράς των ESBLs στο άμεσο περιβάλλον και πρόκλησης επιδημίας. Μελέτη έχει δείξει ότι το 16,7% των συγγενών ατόμου με φορεία ESBLs είναι και οι ίδιοι φορείς. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι για κάθε βακτηριαμιά αντιστοιχούν 4 αποικισμοί [440-442]. Λόγω του μικρού οικονομικού κόστους, αλλά και της εύκολης εκτέλεσης και ερμηνείας του θα μπορούσε να συμβάλλει στο να γίνεται ευρύς έλεγχος της φορείας των ασθενών τόσο κατά την εισαγωγή όσο και κατά την έξοδο τους από το νοσοκομείο, ειδικά όταν είχαν νοσήσει από ανθεκτικό στέλεχος ή όταν είναι γνωστό ότι στο νοσοκομείο ενδημούν τέτοια στελέχη. Το τακτικό follow up θα πρέπει να συνεχίζεται και μετά την έξοδο του ασθενούς, όταν κρίνεται απαραίτητο. Επίσης, θα μπορούσε να εφαρμοστεί στον έλεγχο φορείας του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού.

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) είναι χαμηλού κόστους μέθοδος και αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη διαμόρφωση του επιδημιολογικού χάρτη, ιδιαίτερα σε χώρες με χαμηλούς πόρους και σύνθετη επιδημιολογία ως προς τη διασπορά των β-λακταμασών. Ανίχνευει με αξιοπιστία την παραγωγή ESBLs, ακόμη και εκείνων που «κρύβονται» κάτω από την παραγωγή άλλων β-λακταμασών, με συνέπεια να μην χάνονται πολύτιμα δεδομένα.

4.Συμπέρασμα

Με την παρούσα διατριβή θελήσαμε να προτείνουμε μία τροποποίηση του CLSI ESBL Confirmatory Test με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, ιδιαίτερα σε μια εποχή στην οποία η επιδημιολογία των ESBLs και των άλλων β-λακταμασών γίνεται όλο και πιο σύνθετη.

Η τροποποίηση του CLSI ESBL Confirmatory Test με τη σύγχρονη προσθήκη 400μg βορονικού και 292μg EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών όντως οδήγησε στη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) έχει ευαισθησία 97,5% και ειδικότητα 100% στην ανίχνευση των ESBLs στα εντεροβακτηριακά, σε αντίθεση με το CLSI ESBL Confirmatory Test, που έχει ευαισθησία 65,4% και ειδικότητα 97,1%. Όσον αφορά στην ανίχνευση των ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa*, αν και το βακτήριο αυτό είναι εκτός των επίσημων συστάσεων εφαρμογής του CLSI ESBL Test, με την τροποποίηση αυτή κατέστη δυνατή η ανίχνευση της παραγωγής των ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa*, είτε αυτά παράγουν μόνο ESBLs είτε παράγουν ταυτόχρονα ESBLs και MBL. Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) έχει ευαισθησία 100% και ειδικότητα 100% στην ανίχνευση των ESBLs στην *P.aeruginosa*, σε αντίθεση με το CLSI ESBL Confirmatory Test, που έχει ευαισθησία 70,3% και ειδικότητα 92,5%. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την αξιολόγηση του τροποποιημένου τεστ (modified CLSI ESBL test) σε στελέχη ψευδομονάδας που παράγουν άλλες καρβαπενεμάσες, όπως KPCs, καθώς το βορονικό οξύ αναστέλλει τη δράση αυτών των ενζύμων.

Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για επιδημιολογικούς σκοπούς και για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, ενώ μπορεί να συμβάλλει στην αποκλιμάκωση της θεραπείας. Είναι μια μέθοδος ανίχνευσης των ESBLs υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, χαμηλού κόστους και δεν απαιτεί μεγάλη επιδεξιότητα. Τα αποτελέσματά του ερμηνεύονται άμεσα και με σαφήνεια χωρίς την προϋπόθεση της γνώσης της ταυτόχρονης παρουσίας άλλων β-λακταμασών. Μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε στελέχη εντεροβακτηριακών όσο και σε στελέχη *P.aeruginosa* χωρίς να χρειάζεται να γνωρίζουμε προηγουμένως αν παράγουν ταυτόχρονα AmpCs ή καρβαπενεμάσες.

5. Βασικά σημεία της διατριβής

- Η μικροβιακή αντοχή στα Gram-αρνητικά βακτήρια αποτελεί μείζον θέμα Δημόσιας Υγείας. Υπολογίζεται ότι παγκοσμίως κατ' έτος πεθαίνουν από ανθεκτικά μικρόβια 700.000 άνθρωποι και ότι αν δεν ληφθούν μέτρα, ο αριθμός αυτός προβλέπεται το 2050 να ανέλθει στα 10 εκατ.
- Η υπερκατανάλωση των αντιβιοτικών στους ανθρώπους και στη ζωοτροφία, η φαρμακευτική ρύπανση, οι μετακινήσεις πληθυσμών και αγαθών, οι ανεπαρκείς υγειονομικές συνθήκες σε αρκετές χώρες, οδήγησαν στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών.
- Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν φάρμακα πρώτης γραμμής.
- Ο κύριος μηχανισμός αντοχής των Gram-αρνητικών στα β-λακταμικά είναι η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, των β-λακταμασών.
- Η αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς είναι αυξανόμενη τα τελευταία χρόνια. Σε ποσοστό > 85% οφείλεται στην παραγωγή των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBLs).
- Η διασπορά των ESBLs οφείλεται σε επιτυχημένους κλώνους και σε ποικιλία μεταθετών γενετικών στοιχείων.
- Η ανίχνευση των ESBLs από το κλινικό εργαστήριο είναι σημαντική για την καθοδήγηση της θεραπείας, τη συλλογή επιδημιολογικών δεδομένων και την έγκαιρη εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων.
- Το CLSI προτείνει μια φαινοτυπική δοκιμασία επιβεβαίωσης της παραγωγής των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών, το CLSI ESBL Confirmatory Test. Πρόκειται για δοκιμασία συνδυασμένων δίσκων (Combination Disk Test) με τη χρήση 2 κεφαλοσπορινών (κεφταζιδίμη και κεφοταξίμη χωρίς και με κλαβουλανικό οξύ). Η δοκιμασία αυτή είναι προτυποποιημένη για στελέχη *E.coli*, *Klebsiella spp*, *P.mirabilis*. Η δοκιμασία δεν εφαρμόζεται σε στελέχη που παράγουν AmpCs ή καρβαπενεμάσες.
- Η ευρεία χρήση των καρβαπενεμών για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από βακτήρια που παράγουν ESBLs άσκησε πίεση επιλογής και αρκετά βακτήρια εκτός από ESBLs μπορούν να παράγουν ταυτόχρονα και καρβαπενεμάσες.

- Η παραγωγή των ESBLs απαντάται και σε στελέχη που ταυτόχρονα παράγουν και AmpCs .
- Η ταυτόχρονη παραγωγή των ESBLs και των καρβαπενεμασών ή των AmpCs δυσχεραίνει τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs. Οι καρβαπενεμάσες και οι AmpCs υδρολύουν τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία ανίχνευσης, ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Οι ESBLs παραμένουν «κρυμμένες» και η συχνότητά τους υποεκτιμάται.
- Με την παρούσα διατριβή προτείνουμε μία τροποποίηση του CLSI ESBL Confirmatory Test με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.
- Η τροποποίηση αφορά στην προσθήκη 400μg βορονικού και 292μg EDTA στους δίσκους των αντιβιοτικών.
- Το βορονικό οξύ αναστέλλει τη δράση των KPC- καρβαπενεμασών και των AmpCs, ενώ το EDTA αναστέλλει τις μεταλλο-β-λακταμάσες
- Η τροποποίηση του CLSI ESBL Confirmatory Test με την προσθήκη βορονικού και EDTA όντως συνετέλεσε στην βελτιστοποίηση της μεθόδου αυξάνοντας την ευαισθησία και την ειδικότητα.
- Η παρούσα διατριβή χωρίζεται σε 2 μέρη: Στο πρώτο μέρος , εφαρμόζονται το κλασικό και το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) σε 301 στελέχη εντεροβακτηριακών και στο δευτερο μέρος θελήσαμε να εφαρμόσουμε τις δύο μεθόδους σε 67 στελέχη *P.aeruginosa*, καθώς δεν υπάρχει προτυποποιημένη μέθοδος για τη φαινοτυπική ανίχνευση των ESBLs σε στελέχη *P.aeruginosa*.
- Τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα φαινοτυπικά τεστ είναι αναξιόπιστα και υποεκτιμούν τη συχνότητα των ESBLs στην *P.aeruginosa*, καθώς εμπλέκεται η υπερπαραγωγή της ενδογενούς χρωμοσωμικής AmpC-β-λακταμάσης και η ταυτόχρονη παραγωγή καρβαπενεμασών.
- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) αποκάλυψε την παραγωγή των «κρυμμένων» ESBLs σχεδόν σε όλα τα εντεροβακτηριακά που ταυτόχρονα παράγουν καρβαπενεμάσες ή AmpC-β-λακταμάσες (106 από τα 108, ευαισθησία 98,1%). Αντιθέτως, το CLSI ESBL Test ανίχνευσε την παραγωγή

των «κρυμμένων» ESBLs σε μόλις 53 από τα 108 στελέχη που εκτός από ESBLs ταυτόχρονα παράγουν καρβαπενεμάσες ή AmpCs (ευαισθησία 49,1%).

- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) εντόπισε την παραγωγή των «κρυμμένων» ESBLs σε όλα τα στελέχη *P.aeruginosa* που ταυτόχρονα παράγουν MBLs (ευαισθησία 100 %), ενώ το CLSI ESBL Confirmatory Test εντόπισε μόνο 4 από τα 10 στελέχη *P.aeruginosa* (ευαισθησία 40 %).
- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) ήταν ισάξιο του CLSI ESBL Confirmatory Test στην ανίχνευση ESBLs σε στελέχη που παράγουν αποκλειστικά ESBLs.
- Όσον αφορά στην ανίχνευση των ESBLs στα εντεροβακτηριακά, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) έχει ευαισθησία 97,5% και ειδικότητα 100%, σε αντίθεση με το CLSI ESBL Confirmatory Test , που έχει ευαισθησία 65,4% και ειδικότητα 97,1%.
- Όσον αφορά στην ανίχνευση των ESBLs σε *P.aeruginosa*, το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) έχει ευαισθησία 100% και ειδικότητα 100%, σε αντίθεση με το CLSI ESBL Confirmatory Test , που έχει ευαισθησία 70,3% και ειδικότητα 92,5%.
- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) μπορεί να εφαρμοστεί και σε στελέχη *P.aeruginosa*. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την αξιολόγηση του τροποποιημένου τεστ σε στελέχη ψευδομονάδας που ταυτόχρονα παράγουν KPCs , καθώς το βορονικό οξύ αναστέλλει τη δράση αυτών των ενζύμων.
- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI test) είναι αξιόπιστο, έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, εφαρμόζεται με απλά βήματα , έχει χαμηλό κόστος και τα αποτελέσματά του ερμηνεύονται άμεσα και με σαφήνεια χωρίς την προϋπόθεση της γνώσης της ταυτόχρονης παρουσίας καρβαπενεμασών ή AmpCs.
- Το τροποποιημένο τεστ (modified CLSI ESBL test) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για επιδημιολογικούς σκοπούς και για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, ενώ μπορεί να συμβάλλει στην αποκλιμάκωση της θεραπείας.

III. Βιβλιογραφία

1. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: Are we in the post antibiotic era? *Arch Med Res* 2005 ; 36: 697-705
2. Infectious Diseases Society of America. Bad drugs, no drugs: as antibiotic discovery stagnates, a public health crisis blew. Alexandria, VA, IDSA ,2004
3. Center for Disease Control and Prevention. World Health Day: Media Fact Sheet. Available at: www.cdc.gov/media/releases/2011/f0407_antimicrobialresistance.pdf
4. Holmes NE, Howden BP, The rise of antimicrobial resistance: a clear and present danger. *Expert Rev Anti Infect Ther* ,2011;9:645-648
5. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the future health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance; AMR CONTROL 2015 - GLOBAL HEALTH DYNAMICS WORLD ALLIANCE AGAINST ANTIBIOTIC RESISTANCE (WAAAR), ISBN 978-0-9576072-3-1
6. Magiorakos AP et al Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 ; 18(3):268-81.
7. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Rep* 2014;129(4):314-316
8. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
9. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/
10. Dye PC .After 2015: infectious diseases in a new era of health and development 2014 Trans. R. Soc. B369
11. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1999 Jul 30;48(29):621-9.
12. Congressional Research Service Report. Life expectancy in the US, Available at www.cnire.org
13. http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/mbd/life_expectancy/atlas.html
14. Hoyert DL, Kochanek KD, Murphy SL. Deaths: final data for 1997. Hyattsville, Maryland: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC, National Center for Health Statistics, 1999. (National vital statistics reports, vol 47, no. 19).
15. National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD & TB Prevention
16. Michael CA et al. The antibiotic resistance crisis:causes,consequences, and management. *Front Public Health*. 2014;2:145
17. Busk K et al. Tackling antibiotic resistance *Nature Rev Microb* 2011;9:894-896

18. ECDC, SURVEILLANCE REPORT. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013 http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx
19. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
20. Maragakis LL, Cosgrove SE. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6: 751-63.
21. Reed S et al, Socioeconomic issues related to antibiotic use. The Royal Society of Medicine Press,2001,41-46
22. Laxminarayan R et al. Antibiotic Resistance-the need for global solutions, *Lancet Infect Dis* 2013;13: 1057-98
23. European Medicine Agency. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug resistant bacteria in EU and the development of new antibacterial agents 2009, Stockholm, Sweden, European Centre for Disease Prevention and Control . Available at: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf
24. Consgrove SE et al, The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality ,length of hospital stay and health care costs. *Clin Infect Dis* 2006 , 42 (suppl.2) ,82-89
25. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance ,*BMJ* 2013;346:1493
26. <http://www.mednet.gr/whonet/>
27. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY:AN OVERVIEW OF OUR WORK THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2015, Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf
28. Pitout et al, Molecular characteristics of travel-related ESBL producing E.coli. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1726-1731
29. ECDC, European Antibiotic Awareness Day – Factsheet for Experts, <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/antibioticsgetinformed/factsheets/Pages/experts.aspx>
30. Ruppé E et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis*. 2015 . 15;61(4):593-600
31. Cooper M et al, Fix the antibiotics pipeline. 2011 *Nature* ;472(32)
32. Brown E et al, Antibacterial drug discovery in the resistance era , 2016, *Nature* 529,336-343

33. Goosens H et al, Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance : a cross-national database study, *Lancet*, 2005,365:579-587
34. Bell BG et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases* 2014, 14:13
35. A Fleming. Penicillin. Nobel lecture ,11 December 1945
36. Morgan DJ et al, Non -prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:672-701.
37. Special Eurobarometer 338 'Antimicrobial Resistance',2009. Available at <http://ec.europa.eu/publicopinion/indexfr.htm>
38. Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey . World Health Organization. ISBN 978 92 4 150981 7
39. Van Boeckel, T P et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14: 742–750.
40. http://www.cddep.org/tool/changes_antibiotic_consumption_high_income_countries_2000_2010#sthash.n8EmaFPs.mL9bJsqS.dpuf
41. <https://resistancemap.cddep.org>
42. ESAC-Net data on antimicrobial consumption, TeSSy. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial-resistance-and-consumption>
43. Monnet L et al, How to Measure Antimicrobial Consumption , Dominique National Center for Antimicrobials and Infection Control, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark,2014, Available at https://www.whocc.no/atc_ddd_index/
44. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*. 2001; 1: 314-25
45. Commission Directive 97/6/EC of 30 January 1997 amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs, Official Journal L 035 , 05/02/1997 P. 0011-0013
46. Wegener HC et al. Use of antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and Enterococcus faecium Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe .*Emerg Infect Dis*.1999;5(3):329-335.
47. http://www.cddep.org/tool/antimicrobial_use_food_producing_animals_increased_us_during_2009_14#sthash.PgEFbQkN.dpbs
48. EU/EEA Regulation (EC) No 726/2004, Directive 2001/82/EC
49. Liu YY, Wang et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.

50. Skov R, Monnet D. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 2016;21(9):pii=30155.
51. Pendleton JN et al, Clinical Relevance of the ESKAPE pathogens, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(8):893-902
52. Wegener HC . Antibiotics in Animal Feed and their role in Resistance Development. *Curr Opin Microbiol.*2003;6(5):439-445
53. Aminov et al, Evolution and Ecology of antibiotic resistance genes,*FEMS Microbiol.* 2007; 271:147-161
54. Gorbach SL, Antimicrobial use in Animal Feed: Time to Stop. *N Engl J Med.* 2001;345(16):1202-1203
55. Rehman M, Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries, *Chemosphere*,2015;138 :1045–1055
56. Larsson D.G. Extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Material.* 2007; 148: 751-755.
57. Lindberg RH , Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ. Sci. Technol.* 2005;39: 3421–3429
58. Larsson DGJ. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 2007;148:751–755.
59. Rutgersson C et al, Fluoroquinolones and qnr genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48: 7825–7832
60. Fick J et al, Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009;28: 2522–2527.
61. Bengtsson-Palme J, Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Front. Microbiol.* 2014 ;5:Article 648
62. Walsh TR ,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(5):355-362.
63. Groundwater PW et al, New Delhi metallo- β -lactamase-1: structure, inhibitors and detection of producers. *Future Medicinal Chemistry,* 2016 ; 8(9) 9 :993-1012
64. Mojica MF, Bonomo RA, B1-Metallo-beta-Lactamases: Where do we stand? *Curr Drug Targets.* 2016; 17(9): 1029–1050.

65. Bouki C, Venieri D, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in waste water treatment plants:a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;91:1-9
66. Wagner M,Loy A , Bacterial community composition and function in sewage treatment systems . *Curr Opin Biotechnol*, 2002;13:218-227
67. Yuo Li et al., Proliferation of Multidrug-Resistant New Delhi Metallo- β -lactamase Genes in Municipal Wastewater Treatment Plants in Northern China, *Envirov Science Technol*, 2014;
68. Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ. Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13:396.
69. Marathe NP, Larsson DGJ et al. A treatment plant receiving waste water from multiple bulk drug manufacturers is a reservoir for highly multi-drug resistant integron-bearing bacteria. *PLoS One.* 2013;8:e77310.
70. Pal C, Larsson DJC et al .The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes *Microbiome*; 2016: 4(54)
71. Cao C, Jiang Wet al. Inhalable microorganisms in Beijing's PM2.5 and PM10 pollutants during a severe smog event. *Environ Sci Technol.* 2014;48:1499–507.
72. Yooseph S et al. A metagenomic framework for the study of airborne microbial communities. *PLoS One.* 2013;8:e81862.
73. Chapin A, Rule A et al .Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environ Health Perspect.* 2005;113:137–42.
74. Teixeira JV, Ferreira HN. Multidrug-resistant Enterobacteriaceae from indoor air of an urban wastewater treatment plant. *Environ Monit Assess.* 2016;188:388.
75. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2016. Available at: http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
76. Woolhouse M, Farrar J. et al .Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Phil. Trans. R. Soc.* 2015 ;B 370:1-7
77. Memish ZA,Shibl AM et al,Impact of travel on international spread of antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 21:135-142
78. MacPherson DW et al, Popoulation mortality,globalization and anticrobial drug resistance. *Emerg Infect Dis* .2009;15:1727-1732
79. WHO-UNICEF (2015),Progress on Drinking Water and Sanitation: 2015 update. Available at https://www.wssinfo.org/JMP-Update-report-2015_English.pdf
80. UN News Center,2014. Campaign to end open defecation. Available at: <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=47908#.WJMSbFOLSM9>

81. Ling et al, A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 2015;517(7535):455-459.
82. Holmes NE, Howden BP, The rise of antimicrobial resistance:a clear and present danger. *Expert Rev Anti Infect Ther* ,2011;9:645-648
83. Spellberg B ,The future of antibiotics, *Critical Care* ,2014;18:228
84. Sharma P,Towse A , New Drugs to Tackle Antimicrobial Resistance: Analysis of EU Policy Options, Office of Health Economics,2011. Available at:
<https://www.ohe.org/publications/new-drugs-tackle-antimicrobial-resistance-analysis-eu-policy-options>
85. Projan SJ, Shlaes DM. , Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? *Clin Microbiol Infect.* 2004 Nov;10 Suppl 4:18-22.
86. Shlaes D et al, The FDA Reboot of Antibiotic Development, *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 ; 57(10): 4605–4607
87. FDA-Approved Diabetes Medicines.2016. Available at :
<http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/Diabetes/ucm408682.htm>
88. Leung E et al. The WHO policy package to combat Antimicrobial Resistance. *Bull WHO* 2011;89:390-392
89. Spellberg et al. The epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A call to Action fr the medical community from the Infectious Diseases Society of America *Clin Inf Dis* 2008;46:155-164
90. UK Antimicrobial Resistance Strategy and Action Plan .2000. Available at:
<http://antibiotic-action.com/wp-content/uploads/2011/07/DH-UK-antimicrobial-resistance-strategy-and-action-plan.pdf>
91. WHO, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Available at:
http://webitpreview.who.int/entity/drugresistance/amr_global_action_plan/en/index.html
92. White House ,March 2015. National Action Plan for Combating Antibiotic Resistant Bacteria (2015-2020). Available at: <http://obamawhitehouse/archives.gov>
93. Australia, National Antimicrobial Resistance Strategy 2015-2019 , ISBN 978-1-76007-192-9

94. Canada, Antimicrobial Resistance and Use in Canada; A federal Framework for Action ISBN 978-1-100-25126-4
95. Team C. "Chennai Declaration": 5-year plan to tackle the challenge of anti-microbial resistance. *Indian J Med Microbiol* 2014;32:221-8
96. Goossens H. The Chennai declaration on antimicrobial resistance in India. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 105–06.
97. Special Eurobarometer 445, AMR, April 2016. Available at: http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/docs/eb445_amr_generalfactsheet_en.pdf
98. Action plan against the rising threats from antimicrobial resistance (COM(2011) 748), November 2011. Available at: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2011:0748:FIN:EN:PDF>
99. Prudent use of antimicrobial agents in human medicine: third report on implementation of the Council recommendation, 2016, EUROPEAN COMMISSION, ISBN 978-92-79-57568-6 Available at: http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/docs/amr_projects_3rd-report-councilreprudent.pdf
100. Yonghong Xiao, China's national plan to combat antimicrobial resistance 2016; *Lancet Infect Dis* 16 (11):1216–1218
101. Υπουργείο Υγείας Ελλάδας, Εθνικό Σχέδιο Δράσης για τη Δημόσια Υγεία, 2008 - 2012. Available at: file:///C:/Users/Administrator/Downloads/MIKROBIAKH_ANTOXH_TELIKO.pdf
102. Μέτρα, όροι και διαδικασίες για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων που συνδέονται με τη νοσηλεία των ασθενών στους χώρους παροχής υγείας. Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, 18 Φεβρουαρίου 2014, Αθήνα, Ελλάδα; 388B: 5103- 51010.
103. United Nations, Political declaration of the high-level meeting of the General Assembly on antimicrobial resistance. Available at: http://www.un.org/pga/71/wp-content/uploads/sites/40/2016/09/DGACM_GAEAD_ESCAB-AMR-Draft-Political-Declaration-1616108E.pdf
104. Tortora G, Funke B, Case C. Μικροβιολογία, επιμέλεια Τσακρής Αθ., εκδ Πασχαλίδης
105. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora *Trends Microbiol* 1996; 4:430-451

106. Schaechter M et al, Microbiology in the 21st century: where are we and where are we going?. Washington, *American Society for Microbiology*, 2004 .Available at: <https://www.asm.org/images/stories/documents/microbiologyinthe21stcentury.pdf>
107. Schopf JW, Packer BM .Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia, *Science* , 1987;277:70-73
108. Hall BG, Barlow M, Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future, *Drug Resist Updat*, 2004; 7: 111-123
109. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) , Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables), Expert Rules Version 3.1,2016.Available at: http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/
110. You Y, Silbergeld EK , Learning from agriculture: Understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Front Microbiol* 2014;5: 284
111. Chantziaras I et al, Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(3):827–834.
112. Tilman D et al , Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(50):20260–20264.
113. Guo X et al, Structural change in the impact of income on food consumption in China, 1989–1993. *Econ Dev Cult Change* 2000; 48(4):737–760
114. Silva NCC et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows in Brazil. *J Dairy Sci* 2011; 96(11):6856-62
115. Zhu Y-G, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9):3435–3440.
116. D'Costa VM et al, Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477:457–461.
117. Perron GG et al. Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PLOS ONE* 2015; 10(3): e0069533.
118. Nadell, C.D et al, The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009; 33: 206–224.
119. Camilli, A.; Bassler, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006; 311:1113–1116.
120. Zhou et al, The 3 bacterial lines of defence against antimicrobial agents, *Int J Mol Sci* 2015; 16: 21711-21733

121. Frère JM, Page MG .Penicillin-binding proteins: evergreen drug targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2014; 18: 112-9.
122. Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annual Review of Biochemistry* 1983; 52 :825-867
123. Macheboeuf P et al. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30 (5): 673-691.
124. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones . *Clin Infect Dis* . 2005; 41: S120-S126
125. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones . *Mayo Clin Proc* .2012 ; 87 (2): 198-208
126. Mingeot-Leclercq MP et al, Aminoglycosides: Activity and resistance *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 727-737
127. Doi Y, Arakawa Y. 16S rRNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides . *Clin Infect Dis* 2007;45:88-94
128. Sulavik MC et al, Antibiotic susceptibility profiles of *E.coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1126-1136
129. Levin ME, Hatfyll GF. Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: mechanism of rifampicin resistance *Mol Microbiol* 1993;8:277-285
130. Κ. Νταφοπούλου, Α. Πούλου Α. Τσακρής, Σ. Πουρνάρας Μεταλλάξεις σχετιζόμενες με ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter baumannii* *Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας* 2013;58(4):19-26
131. Olaitan A et al, Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria, *Front Microbiol.* 2014; 5: 643.
132. Thaker M et al, The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:419-431
133. Bush K, Page MG. What we may expect from novel antibacterial agents in the pipeline with respect to resistance and pharmacodynamic principles. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn.* 2017[Epub ahead of print]
134. Abraham EP, and Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940 ; 146:837.
135. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* 1965 ;208(5007):239-41.

136. Schwarz S et al, Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:519-542
137. Baceiro A et al. Antimicrobial Resistance and Virulence: A successful or Deleterious Association in Bacterial World? *Clin Microb Rev* 2013;26(2):185-230
138. Howden BP et al, The evolution of vancomycin intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and heterogenous-VISA . *Infect Genet Evol.* 2014 ;21:575-82.
139. Nikaido H .Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Rev.* 2003;67: 593-656
140. Yu-Kuo Tsai et al, *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(4): 1485–1493.
141. Long KS et al, The Crf rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2500-5
142. Xian-Zhi Li et al. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria *Clin. Microbiol. Rev.* 2015;28 (2): 337-418
143. Yamagushi A et al. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol* 2015;6:327
144. Du D et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 2014;509:512-515
145. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms . *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3:255-264
146. Ogawa et al . Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *K.pneumoniae*. *Gene* 2012;498:177-182
147. Kim DK et al. Gene cloning and characterization of MdeA , a novel multidrug efflux pump *J Microbiol Biotechnol* 2013;23:430-435
148. Del Pojo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 ;82(2):204-9.
149. Leclercq R et al. Resistance of *enterococci* to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis* 1992;15:495-501
150. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease *Nature Reviews Microbiology* 2007;5:48–56

151. Cohen N et al. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 632–642
152. Andersson D , Hughes D, Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics *Nature Reviews Microbiology*, 2014; 12: 465–478
153. Chiang WC et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*2013 ;57(5):2352-61
154. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2015; 41 (3): 341-52.
155. Marles-Wright J , Lewis RJ . Stress responses of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* 2007 ; 17(6): 755–760
156. Gurung M et al, *S.Aureus* produces membrane –derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* 2011; 6:e27958
157. Jagannadham MV ,Chattopadhyay MK, Role of Outer Membrane Vesicles of Bacteria, *RESONANCE*, 2015; 711-725
158. Kadurugamuwa JL,Beveridge TJ. Virulence factors are released from *P.aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin : a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* 1995 ; 177:3998-4008
159. Manning AJ,Kuehn MJ, Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense, *BMC Microbiol* 2011;11:258
160. Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance *Clin Infect Dis* 2003;37:1201-1209
161. van Hoek AH et al, Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011; 28(2):203.
162. Thomas CM, Nielsen KM , Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 711–721.
163. Gillings MR,Stokes HW. Are humans increasing bacterial evolvability? *Trends Ecol Evol* 2012;27:346-352
164. Žgur-Bertok D. Miller V. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. *PLoS Pathogens.* 2013; 9(11):e1003711
165. Schwechheimer C,Kuehn M.Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions *Nature Reviews Microbiology* 2015;13: 605–619
166. Chattopadhyay MK, Jagannadham MV. Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 2015;6:758

167. Zhang L, Mah TF. Involvement of a novel efflux system in biofilm specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol* 2008;190:4447-4452
168. Watanabe T. Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. *Bacteriological Reviews* 1963; 27: 87-115
169. Koraimann G, Wagner MA .Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;29(4)54
170. Domingues S et al. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species *PLoS Pathogens* 2012;8(8):e1002837
171. Harper DR et al. Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics.* 2014; 3 (3):270-284.
172. Toussaint A ,Merlin C. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid.*2002;47(1):26-35.
173. Cohen S. N. Bacterial plasmids: their extraordinary contribution to molecular genetics. *Gene* 1993;135: 67–76
174. Salyers AA et al. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological Reviews.* 1995; 59(4):579-590.
175. Pray L. Transposons: The jumping genes. *Nature Education* 2008; 1(1):204
176. Cambray G et al, Integrons. *Annu Rev Genet* 2010; 44: 141–166
177. Gillings M et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 2008; 190: 5095–5100.
178. Hall RM, Collis CM, Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995;15: 593–600.
179. Bhullar K et al. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE* 2012;7(4): e34953.
180. Pal C et al . The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes *Microbiome* 2016; 4:54
181. Gerard D. Wright The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5:175–186
182. Perry JA, Wright GD The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol.* 2014 Oct;21:45-50.
183. Robicsek A et al, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase *Nat Med.*2006 ;12(1):83-8.

184. Beaber JW et al, SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*.2004;427(6969):72-4
185. Chen I., Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* 2004 ;2: 241–249
186. Cook L et al, Biofilm growth alters regulation of conjugation by a bacterial pheromone. *Molecular microbiology*. 2011;81(6):1499-1510.
187. Frost LS ,Koraimann G. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiology* 2010;5(7):1057-1071
188. Forsberg KJ et al . The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 2012;337(6098):1107-1111
189. Hatosy SM, Martiny AC. The Ocean as a Global Reservoir of Antibiotic Resistance Genes. *Applied Environ Microbiol*. 2015;81(21):7593-7599.
190. Aminov RI. Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2:158
191. Bernier SP et al. Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS Genetics*. 2013; 9(1):e1003144.
192. Cohen N et al. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 632–642
193. Helmann JD . The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol*. 2002; 46:47-110.
194. Kang CI, Song JH. Antimicrobial Resistance in Asia: Current Epidemiology and Clinical Implications. *Infection & Chemotherapy*. 2013;45(1):22-31
195. Kaye KS, Pogue JM Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy* 2015; 35(10):949-962.
196. Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2015.Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>
197. LB .Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE *J Infect Dis* 2008 ; 197 (8): 1079-1081.
198. Paramythiotou E, Routsis C. Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. *World Journal of Critical Care Medicine*. 2016;5(2):111-120
199. WHO, Health care without avoidable infections The critical role of infection prevention and control. 2016.

Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246235/1/WHO-HIS-SDS-2016.10-eng.pdf?ua=1>

200. Benedetta Allegranzi et al, Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2011; 377 (9761): 228–241

201. Garner JS et al. CDC Definitions for nosocomial infections *Am J Infect control* 1988;16: 128-140

202. Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team , Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections *N Engl J Med* 2014;370(13) 1198-1208

203. Amin A, Deruelle D . Healthcare-associated infections, infection control and the potential of new antibiotics in development in the USA. *Future Microbiology* 2015; 10 (6): 1049-1062

204. National Action Plan to Prevent Health Care-Associated Infections: Road Map to Elimination (*HAI Action Plan*). Available at: <https://health.gov/hcq/prevent-hai-action-plan.asp>

205. National and State Healthcare Associated Infections Progress Report 2016, CDC Available at: <https://www.cdc.gov/HAI/pdfs/progress-report/hai-progress-report.pdf>

206. Haley RW et al. The SENIC Project. Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project). Summary of study design. *Am J Epidemiol.* 1980; 111(5):472-85.

207. ECDC, Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012.

Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>

208. ECDC,EFSA, EMA. The first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antibiotic resistance in bacteria from human and food producing animals. *EFSA Journal* 2015;13(1)4006 ,p114

209. Sader HS et al. Antimicrobial susceptibility of gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(4): 443-448.

210. MacVane SH. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. *Journal of Intensive Care Medicine* 2017; 32(1):25-37

211. Peleg A, Hooper D. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria *N Engl J Med.* 2010; 362(19): 1804–1813.

212. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):848-54

213. Borna M et al. Antimicrobial Resistance in Hospital-Acquired Gram-Negative Bacterial Infections. *Chest* 2015 ; 147(5): 1413–1421.
214. Salles MJC et al. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*. 2013;141(12):2459-2472.
215. Ling TKW et al. Multicenter Antimicrobial Susceptibility Survey of Gram-Negative Bacteria Isolated from Patients with Community-Acquired Infections in the People's Republic of China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(1):374-378.
216. Rossignol L et al. Incidence of urinary tract infections and antibiotic resistance in the outpatient setting: a cross-sectional study. *Infection*. 2017 ;45(1):33-40
217. Doi Y, Paterson DL et al Community-Associated Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. *Clin Infect Dis* 2012; 56 (5): 641-648.
218. Livermore D et al A Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Nonhospitalized Patients *Clin Infect Dis* 2009;49 (5): 682-690.
219. Pitout JD Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008 ;6(5):657-69
220. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 ;8(3):159-166
221. Pitout JD. Enterobacteriaceae that Produce Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in the Community: The Tip of the Iceberg? *Curr Pharm Des* 2013; 19(2):257 – 263
222. Castillo-Tokumori F et al . Worrisome high frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary tract infections: a case-control study. *Int J Infect Dis*. 2016;55:16-19
223. Jing Zhang et al. High Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Onset Infections in China. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1830.
224. Pitout JD et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*. 2005 ;56(1):52-9
225. Shah UM et al . Gram negative organisms in community acquired respiratory tract infections *J Microbiol Infect Dis* 2013;3 (1):8-11
226. Sanchez GV et al .In Vitro Antimicrobial Resistance of Urinary *Escherichia coli* Isolates among U.S. Outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4): 2181–2183.
227. Nicolas-Chanoine MH et al Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):273-81

228. Rogers BA ,Paterson DL. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011 ;66(1):1-14
229. Peirano G,Pitout JDD. Molecular Epidemiology over an 11-Year Period (2000 to 2010) of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli Causing Bacteremia in a Centralized Canadian Region. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(2):294-299.
230. Quan J et al. High prevalence of ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in community-onset bloodstream infections in China. *J Antimicrob Chemother.* 2017 ;72(1):273-280.
231. Laupland KB, Church DL. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clinical Microbiology Reviews.* 2014;27(4):647-664
232. Harbarth S,et al. Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 2015;4:49
233. Pathak A et al. Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among women attending antenatal clinics in Central India. *BMC Infectious Diseases.* 2013;13:199
234. Nordstrom L, Liu CM, Price LB. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Frontiers in Microbiology.* 2013;4:29.
235. Manges AR et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant Escherichia coli causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathog Dis.* 2007 ;4(4):419-31.
236. Leverstein-van Hall MA et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jun;17(6):873-80.
237. Neuhauser MM et al. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA* 2003; 289: 885-9.
238. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:466 -475.
239. Peirano G,Pitout J, Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *E.coli.* *J Trave Med,*2011;18:299-303
240. Chen LH, Wilson ME. The role of the traveler in emerging infections and magnitude of travel. *Med Clin North Am ,* 2008; 92:1409-1432
241. Laupland KB et al. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J Infect* 2008; 57:441-448.

242. HCDCP .Action Plan to combat infections due to carbapenem-resistant, Gram-negative pathogens in acute-care hospitals in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014 ;2(1):11-16.
243. Giakkoupi P et al : VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J. Clin Microbiol.* 2003;41:3893-6
244. Ikonomidis A et al.Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene, *J Clin Microbiol* , 2005; 43: 5344-5347
245. Giakkoupi P et al: An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1510-3.
246. Maltezou HC et al.Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece) *J Infect* 2009; 58:213-219
247. Tsakris A et al, 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): 1257-1260.
248. Pournaras S et al, Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece *J Antimicrob Chemother.* 2009 ;64(2):348-52.
249. Spyropoulou A et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol.*2016 ;65(3):240-6
250. Bathoorn E et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71(5):1207-12
251. Mavroidi A et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, blaKPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microb Drug Resist.* 2016 ;22(5):392-8.
252. Voulgari E et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(8):2091-7
253. Giakkoupi P et al: Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 77: 382-384.
254. Voulgari E et al: Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone.*J Antimicrob Chemother.* 2013;68:84-8.
255. Liakopoulos A et al identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011 *Euro Surveill.* 2012;17(11): 20117.
256. Gogou V et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:2767-72

257. Pournaras S et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(3):557-61.
258. Zarrilli R, Pournaras S et al . Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:11-9.
259. Voulgari E et al. First report of an NDM-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 ; 48(6):761-762.
260. Tsakris A et al. Large dissemination of VIM-2-metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3524-9.
261. Pournaras S et al. Hospital outbreak of multiple clones of *P. aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J Antimicrob Chemother.* 2003 ;51(6):1409-14.
262. Tsakris A et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece *J Clin Microbiol.* 2000 ;38(3):1290-2.
263. Liakopoulos A et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 505.
264. Mavroidi A, Tsakris A et al. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2000 ; 46(6):1041-2.
265. Tsakris A et al. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jul;60(1):136-9.
266. Oikonomou O et al. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (blaSHV-5, blaVEB-1), Carbapenem (blaVIM-1), and Aminoglycoside (rmtB) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microb Drug Resist.* 2016 Jul;22(5):379-86.
267. Douka E et al. Emergence of a pandrug-resistant VIM-1-producing *Providencia stuartii* clonal strain causing an outbreak in a Greek intensive care unit. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(5):533-536
268. Miriagou V et al. *Escherichia coli* with a selftransferable, multiresistant plasmid coding for metallo-b-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 395–397.
269. Scoulica EV et al. Spread of VIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;48(3):167-172
270. Galani I et al. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harboring the same transferable plasmid

- coding for metallo- β -lactamase VIM-1 in Greece *J Antimicrob Chemother* 2007;59 (3): 578-579.
271. Ikonomidis A et al. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo-beta-lactamase and SHV-2a extended-spectrum beta-lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist.* 2007;13(4):221-226
272. Vourli S Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the bla metallo-beta-lactamase gene. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):691-694
273. Tsakris A et al. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase and sat1 gene, from *Morganella morganii*, *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(4) : 739-741
274. Mavroidi A et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(3):247-50
275. Kontopoulou K et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β -lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect.* 2010; 76: 70–73
276. Poulou A et al. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant. *J Clin Microbiol.* 2013 Oct;51(10):3176-82.
277. EuSCAPE , Carbapenemase-producing bacteria in Europe Interim results from the European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) project 2013 Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>
278. Hasan CM et al. Dissemination of blaVIM in Greece at the peak of the epidemic of 2005–2006: clonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 147. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013 ;20(1): 34–37
279. Wernli D et al A Call for Action: The Application of the International Health Regulations to the Global Threat of Antimicrobial Resistance. *PLoS Medicine.* 2011;8(4)
280. Paramythiotou E, Routsis C. Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients. *World Journal of Critical Care Medicine.* 2016;5(2):111-120
281. Strominger J.L. Enzymatic reactions in bacterial cell wall synthesis sensitive to penicillins, cephalosprins and other antibacterial agents. *Antibiotics.* 1967;1:705–713
282. Page M.I. The mechanisms of reactions of β -lactam antibiotics. *Adv. Phys. Org. Chem.* 1987;23:165–270
283. Konaklieva M. Molecular Targets of β -Lactam-Based Antimicrobials: Beyond the Usual Suspects *Antibiotics (Basel).* 2014 ; 3(2): 128–142.
284. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;13(1):160-201

285. Elande RP. Industrial production of β -lactam antibiotics *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003;61(5) :385–392
286. Kirby WN. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 1944;99:452-435
287. Richmond M.H., R.B. Sykes, The beta-lactamases of gram-negative Bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol*, 1973; 9:31-88.
288. Matthew M et al. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of b-lactamases *J. Gen. Microbiol.* 1975(88): 169-178.
289. Sykes R.B. ,Matthew M, The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 1976. 2(2): 115-57.
290. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980. 289(1036): 321-31
291. 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.
292. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamses. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:969-976
293. Yigit H et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4):1151-61.
294. Walther-Rasmussen J, Høiby N .Class A carbapenemases.*J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(3):470-82.
295. Queenan AM, Bush K . Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440–458.
296. Lee CR et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7:895.
297. Walsh TR The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(6):2-9.
298. Lauretti L et al .Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate.*Antimicrob Agents Chemother.* 1999 ; 43(7):1584-90.
299. Palzkill T Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 ; 1277: 91-104.

300. Yong D et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53 (12):5046-54.
301. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC b-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Curr Pharm* 1999;5:881-894
302. Jacoby GA .AmpC β -Lactamases *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(1): 161-182
303. Quale J et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(5):1633-1641
304. Lee K et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β -lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:201–206
305. Cao VT et al. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:895–900
306. Tsai YK et al. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. *PLoS One.* 2013 ; 8(11):e79640.
307. Mammeri H et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem – hydrolyzing activities of the plasmid-borne AmpC-b- lactamases. *Anticarb Agents Chemother* 2010;54:4556-4560
308. Jeon JH et al. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(11):2924-36.
309. Kim JY et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. *Mol Microbiol.* 2006 May;60(4):907-16.
310. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews.* 2014; 27(2):241-263.
311. Hall LM et al. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993; 37(8):1637-1644.
312. Bush K, Fisher JF . Epidemiological Expansion, Structural Studies and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:455-478
313. Knothe H et al. Transferable resistance to cefotaxime ,cefotixin , cefmandole and cefuroxime in clinical isolates of *K.pneumoniae* and *S.marcescens*. *Infection* 1983;11(6): 315-317.

314. Sirot D et al. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *K.pneumoniae*: identification of CTX-1 ,a novel b-lactamase *J Antimicrob Chemother* 1987; 20: 323-334
315. Sougakoff W. et al. Plasmid-mediated resistance to third generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillase genes. *Rev Infect Dis* 1988;10:879-884
316. Giske CG et al. Redefining ESBLs: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:1-4
317. Lee JH et al. New definitions of ESBLs conferring world wide emerging antibiotic resistance. *Med Res Rev* 2012;32(1):216-32.
318. Livermore DM. Defining an extended spectrum b-lactamase. *CMI* 2008;14(1):3-10
319. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century; characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933–951
320. Kliebe C et al. Evolution of plasmid coded resistance to broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:302-307
321. Tzouveleakis LS, Bonomo RA. SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5(11):847 864.
322. Liakopoulos A et al . A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology.* 2016;7:1374.
323. Giakkoupi P et al Circulation of a multiresistant, conjugative, IncA/C plasmid within the nosocomial *Providencia stuartii* population in the Athens area.. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 82(1):62-4.
324. Naas T et al. An SHV-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(5):1281-1284.
325. Chen Z et al Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *Int J Clin Exp Med.* 2015 ; 8(10):19400-5.
326. Naas T et al. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(5): 1174-6.
327. REIPI/ESGBIS/INCREMENT Group. Development and validation of the INCREMENT-ESBL predictive score for mortality in patients with bloodstream infections due to extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72 (3): 906-913.

328. Soukakoff W et al. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by 2 amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett* 1988;56:343-348
329. Du Bois SK et al. TEM- and SHV- derived ESBLs: relationship between selection structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:7-22
330. Paterson DL, Bonomo RA. ESBLs: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-686
331. Cantón R. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microb inf* 2008; 14 (1): 144–153
332. Mugnier, P et al. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2488–2493
333. Bauernfeind A et al. A new plasmid cefotaximase in a clinical isolate of *E.coli*. *Infection.* 1990;18:294-298
334. Humeniuk C et al. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(9):3045-9
335. Zhao W-H, Hu Z-Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology.* 2013; 39 (1): 79 - 101.
336. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology.* 2012;3:110.
337. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-75.
338. Livermore DM et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2):165-74
339. Lewis JS et al. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(11):4015-21.
340. Castanheira M et al. Rapid emergence of blaCTX-M among Enterobacteriaceae in U.S. Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microb Drug Resist.* 2008; 14(3):211-216.
341. Munday et al. Dissemination of CTX-M type β -lactamases in Enterobacteriaceae isolates in the People's Republic of China. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:175-180
342. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(5):558-64
343. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74(3):417-433

344. Petty N et al. Global dissemination of a multidrug resistant *E.coli* clone. *PNAS* 2014;111(15):5694-5699
345. Woodford N et al. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:736-755
346. Rogers BA et al. *E.coli* ST131:a pandemic , multiresistant community associated strain *J Antimicrob Chemoth* 2011;66:1-44
347. Mathers AJ et al. The role of epidemic resistance plasmids and international high risk clones in the spread of multi drug resistant *Enterobacteriaceae*. *CMR* 2015 ;28(3):565-591.
348. Peirano G,Pitout JD. Molecular epidemiology of *E.coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:316-321
349. Nicolas-Chanoine MH et al. *E.coli* ST131 ,an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:543-574
350. Tzouveleki LS et al. CTX-M-type β -lactamases :an emerging group of extended spectrum enzymes *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:137-142
351. Chen Y et al. Atomic resolution structures of CTX-M β –lactamases :extended sprctrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol* 2005;348:349-362
352. Ben-Ami R e al. Influx of extended –spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis* 2006;42(7):925-934
353. Canton R et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe *Clin Microbiol Inf* 2008;14(1):144-53
354. Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012;27(2):128-142.
355. Vila J et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(12):2757-9.
356. Nordmann P et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 962–969
357. Vahaboglu et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey; a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2265–2269
358. Miro E, Mirelis, B et al. Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 1152–1155

359. Pagani L, Migliavacca R et al. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis* *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1549–1552
360. Bauernfeind A et al. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 616–620
361. Girlich D et al. PER-6, an Extended-Spectrum β -Lactamase from *Aeromonas allosaccharophila* *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 ; 54 (4):1619-1622
362. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38: 104–114
363. Lahirin SD ,Alm RA . Identification of Novel VEB β -Lactamase Enzymes and Their Impact on Avibactam Inhibition *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016 ; 60(5):3183-3186
364. Poirel L et al. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 573–581
365. Cao V et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3739–3743
366. Naas T et al. VEB-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1214–1222
367. Poirel L et al. . Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended spectrum β -lactamase VEB-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3091–3094
368. Poirel L et al. BEL-2, an Extended-Spectrum β -Lactamase with Increased Activity toward Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (1): 533-535
369. Poirel L et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *K.pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622–632
370. Matsumoto Y, Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 307–313
371. Bonnet R et al. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3061–3068
372. Silva J et al. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 997–1003
373. Girlich D et al. TLA-2, a Novel Ambler Class A Expanded-Spectrum β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11):4767-4770.

374. Jin W et al. New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70 (5) :1331-7
375. Tada T et al. PER-8, a novel extended-spectrum β -lactamase PER variant, from an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Nepal *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 28. pii: AAC.02300-16. [Epub ahead of print]
376. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?db=nucleotide&list_uids=GQ202694&from=1&to=852
377. Drieux L et al. Phenotypic detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Inf* 2008;14(1):90-103
378. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty second informational supplement update. CLSI document M100-S22 U Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
379. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of Four Commercially Available Extended-Spectrum Beta-Lactamase Phenotypic Confirmation Tests. *J Clin Microbiol* 2005; 43(3):1081-1085.
380. Garrec H et al. Comparison of nine phenotypic methods of detection of ESBL production in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2011;49(3):1048-1057
381. Tzelepi et al. Detection of ESBLs in clinical isolates of *Enterobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2000; 38:542-546
382. Song W et al. Detection of ESBLs by using boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *K.pneumoniae* and *E.coli* *J Clin Microbiol* 2007;45(4): 1180-1184.
383. Coudron PE. Inhibitor based methods for detection of plasmid mediated AmpC β -lactamases in *K.pneumoniae*, *E.coli* and *P.mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4163-4167
384. Doi Y et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008 ; 46:4083-4088
385. Pitout JD et al. Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2016;10:165–170.
386. Tsakris A et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3420–3426
387. Nordmann P, Dortet L. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012 50(9):3016-3022

388. Thomson KS, Sanders CC. A simple and reliable method to screen isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* for the production of TEM- and SHV-derived ESBLs. *Clin Microbiol Infect* 1997;3:549-554
389. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI document M100-S24 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
390. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.0, valid from 2017-01-01. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.0_Breakpoint_Tables.pdf
391. Willems E et al. Evaluation of 3 different agar media for rapid detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 ; 76(1):16-9.
392. Pet al Comparison of Five Media for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase by Use of the Wasp Instrument for Automated Specimen Processing *J Clin Microbiol*. 2013 ; 51(8): 2713–2716.
393. Gazin M et al. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* *J Clin Microbiol* 2012; 50(4): 1140–1146.
394. Reglier-Poupet H et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases *J Med Microbiol* 2008; 57: 310–315
395. Harada S et al. ESBLs : Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*. 2008;28: 401-412.
396. Leverstein –van Hall MA et al. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix , VITEK1 , VITEK2 automated instruments for detection of ESBLs in multiresistant *E.coli* and *Klebsiella spp*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3703-3711
397. Stürenburg E et al. Evaluation of the MicroScan ESBL plus confirmation panel for detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of oxyimino-cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2004 ; 54(5):870-5
398. Saffari N et al A comparison of antibiotic disks from different sources on Quicolor and Mueller-Hinton agar media in evaluation of antibacterial susceptibility testing. *Iranian Journal of Microbiology*. 2016;8(5):307-311.
399. Dortet L, Poirel L, Nordmann P . Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from Urine Samples by Use of the ESBL NDP Test *J Clin Microbiol* 2014;52(10): 3701-3706
400. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Blood Cultures *Emerging Infectious Diseases* 2015;21(3):503-507

401. Morosini MI et al. Rapid Detection of β -Lactamase-Hydrolyzing Extended-Spectrum Cephalosporins in *Enterobacteriaceae* by Use of the New Chromogenic β Lacta Test. *J Clin Microbiol* 2014;52 (5):1741-1744.
402. Schwaber MJ, Yehuda C. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis *J Antimicrob Chemother* 2007;60:913– 920
403. Ranellou K et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the bla_{PER}-1 extended-spectrum β -lactamase gene in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2012 ;67(2):357-61.
404. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 1877–1882
405. Compain F et al β LACTA test for rapid detection of *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins from positive blood cultures using briefly incubated solid medium cultures *J Med Microbiol* 2015;64: 1256-1259
406. Frickmann H et al. Emerging rapid testing methods for clinical microbiology laboratories *Biomed Res Int* 2014; ID 375681:1-19
407. Maurin M. Real time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Exp Rev Mol Diagn* 2012;12(7):731-754
408. Dallenne C Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:490–495
409. Fournier PE et al. Modern clinical microbiology : new challenges and solutions . *Nature Rev Microbiol* 2013;11(8):574-585
410. Bumgarner R. DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr protocols mol biol* 2013;22:Unit-22.1.
411. Frye JG et al. Development of a DNA Microarray to Detect Antimicrobial Resistance Genes Identified in the National Center for Biotechnology Information Database. *Microbial Drug Resistance.* 2010;16(1):9-19
412. Frye JG et al. DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 ;27(2):138-51.
413. Faria-Ramos I et al. A novel flow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum β -lactamases *Clinical Microbiology and Infection* 2013;19(1):8–15
414. Samaa T et al. Detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* using the ESBL NDP test and flow cytometric assay in comparison to the standard disc diffusion *Afr. J. Microbiol. Res.* 2015;9(34):1947-1953

415. Tuite N Rapid nucleic acid diagnostics for the detection of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria: is it time for a paradigm shift? *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1729–1733
416. Hooff GP et al. Characterization of b-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI TOF MS *J Proteom Res* 2012;11(1):79-84
417. Ikryannikova LN et al. A MALDI TOF MS based minisequencing method for rapid detection of TEM-type ESBLin Enterobacteriaceae *J Microbiol Methods* 2008;75(3): 385-391
418. Kostrzewa M. et al MALDI-TOF MS an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms *Proteomics* 2013;7(11-12):767-778
419. Thirapanmethee K et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the blaCTX-M9 gene for detection of extended spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Microbiol Immunol.* 2014 ;58(12):655-65
420. Jones CH et al Pyrosequencing using the SNT protocol for rapid determination of TEM and SHV type ESBL in clinical isolates and identification of the novel b-lactamases *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:977-986
421. Marjo Haanperä et al. Typing of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases by Pyrosequencing in *Klebsiella pneumoniae* Strains with Chromosomal SHV β -Lactamase *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008 ;52 (7)2632-2635
422. Poirel L et al. Pyrosequencing as a Rapid Tool for Identification of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):3008-3011.
423. Deccache Y, et al. A qPCR and multiplex pyrosequencing assay combined with automated data processing for rapid and unambiguous detection of ESBL-producers *Enterobacteriaceae*. *AMB Express.* 2015;5:50
424. Veenemans J et al. Next generation sequencing for typing and detection of resistance genes : performance of a new commercial method during an outbreak of ESBL-producing *E.coli* *J Clin Microbiol* 2014;52(7):2454-2460
425. Sherry NL et al. Outbreak investigation using genome sequencing within a diagnostic microbiology laboratory *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1396-1401
426. Koser CU et al. Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology. *PLoS Pathog* 2012;8(8): e1002824.
427. Willyard C. The drug resistant bacteria that pose the greatest health threats –WHO. *Nature* 2017;543 (15)
428. Tatsuki Mura et al. Development of a novel chromogenic method, Penta-well test, for rapid prediction of β -lactamase classes produced in clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *Diagn Microb Inf Dis* 2015;83 (1):25–29
429. van Dijk E et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30:418–426.

430. Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* 2014;30:401–407.
431. Zahar JR et al Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 ; 10(2):172-80.
432. Rossolini GM et al. Epidemiology of infections caused by multiresistant gramnegatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *New Microbiol.* 2007;30: 332–339.
433. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J. Antimicrob.Chemother.* 2009;64:29–36.
434. Schwaber MJ, Carmeli Y.Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis *J Antimicrob Chemother* 2007; 60 : 913–920
435. Coudron PE. Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4163-4167
436. Carattoli A Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2227-38.
437. Livermore DM et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1569-1577.
438. Poirel L et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15–22.
439. Poirel L et al . OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012 ; 67:1597–1606.
440. Tangden T et al. Foreign travel is a major risk factor for colonization with E.coli producing CTX-M type ESBL Q: a prospective study with Swedish volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3564-3568
441. Reddy P et al. Screening for ESBLs producing Enterobacteriaceae among high risk patients and rates of subsequent bacteremia *Clin Infect Dis* 2007;45:846-852
442. Valverde A et al. High rate of intestinal colonization with ESBL producing organisms in household contacts of infected community patients *J Clin Microbiol* 2008;46:2796-2799
443. Dortet L, Nordmann P et al. Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2015; 59(12):7420-7425.
444. Nordmann P et al ,European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432–438

445. Franklin C et al. Phenotypic detection of carbapenem- susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006;44:3139–3144
446. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A et al. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob. Chemother* . 2010;65:1319–1321
447. Chaibi E.B. , Labia R et al. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics *J of Antimicrob Chemother*, 1999;43(4): 447–458
448. Rossolini GM, Mantengoli e. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *P.aeruginosa* . *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(4): 17-32
449. Sader HS , Flamm RK et al. Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: Results from Four years (2012-2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Program in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;61(3). pii: e02252-16.
450. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf
451. Lister PD, Hanson ND et al. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22(4): 582–610.
452. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34(5): 634–40.
453. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *P.aeruginosa* and *A.baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* . 2015; 45:568-585.
454. Hocquet D, Bertrand X et al . Nationwide Investigation of Extended-Spectrum β -Lactamases, Metallo- β -Lactamases, and Extended-Spectrum Oxacillinases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains in France . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54(8):3512-3515
455. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:4783-4788.
456. Weldhagen GF, Nordmann P et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 2385–2392.
457. Mesaros N , Nordmann P, Van Bambeke et al. *P.aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium . *Clin Microb Inf* . 2007;13:560-578

458. Ranellou K, Poulou A, Tsakris A et al. Detection of *P.aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the bla_{PER-1} ESBL gene in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:357-361
459. Poirel, Nordmann P et al. Nosocomial outbreak of ESBL SHV-5-producing isolates of *P.aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(6):2277-2279
460. Umadevi S, Raj S et al. Detection of ESBLs, AmpCs and MBLs in clinical isolates of ceftazidime resistant *P.aeruginosa*. *Braz J Microbiol.* 2011; 42:1248-1284
461. Docquier JD, Rossolini GM et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine- β -lactamase and VIM-2 metallo- β -lactamase. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:910-911
462. Glupcczynski Y, Villalobos H et al. Detection and characterization of class A ESBL – producing *P.aeruginosa* isolates in Belgian Hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:866-871
463. Ktari S, Hammami A et al. Diversity of β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo- β -lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist.* 2011; 17:25-30
464. Jiang X, Lu Y et al. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50(9):2990–2995.
465. Lin SP, Shi ZY et al. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β -lactamases produced by *P.aeruginosa* isolates. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 45:200-207
466. Liscio JL, Hirsch EB et al. Ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam: two novel β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination agents for the treatment of resistant Gram-negative bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46:266-271.
467. Kritsotakis, Evangelos I et al. Prevalence, Incidence Burden, and Clinical Impact of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Resistance: A National Prevalent Cohort Study in Acute Care Hospitals in Greece. *Inf Drug Resistance.* 2017; 10: 317–328.
468. Watanabe M, Iyobe S et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35:147–151
469. Lauretti L, Riccio ML, Rossolini GM et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1584–1590
470. Toleman MA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673–679
471. Castanheira M, Toleman MA, Walsh TR et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, bla_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4654–61

- 472 Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{AIM-1}, and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(12):6154-6159. doi:10.1128/AAC.05654-11.
473. Pollini S, Maradei S, Pecile P, et al. FIM-1, a New Acquired Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate from Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(1):410-416. doi:10.1128/AAC.01953-12.
474. Pfennigwerth N, Lange F, Kaase M et al. Genetic and biochemical characterization of HMB-1, a novel subclass B1 metallo- β -lactamase found in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(4):1068-1073. doi: 10.1093/jac/dkw554.
- 475 Jovčić B, Lepsanovic Z, Suljagic V et al. Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3929–3931
- 476 Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 249856.
477. Kazmierczak KM, Rabine S, Bradford PA et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;60 (2):1067-1078
- 478 Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis*. 2011;. 11:381–393
- 479 Gupta V. Metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 131–43
- 480 Makrishnan K, Rajagopalan S., Chandrakesan SD et al. Molecular characterization of metallo β -lactamase producing multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical samples *Indian J Pathol Microbiol*, 2014;57: 579-582
- 481 Paul D, Dhar D, Chakravarty A., et al. Occurrence of co-existing *bla*_{VIM-2} and *bla*_{NDM-1} in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15:31
- 482 Villegas MV et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007;51:1553–1555.
- 483 Vanegas JM, Cienfuegos AV, Jiménez JN et al. Similar Frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary- Care Hospitals in Medellín, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52(11): 3978–3986
- 484 Martínez T, Vázquez GJ, Robledo IE et al. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2012; 39:542–543.

- 485 Correa A, Montealegre MC, Villegas MV et al, First Report of a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Coharboring KPC and VIM Carbapenemases *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 ; 56 (10):5422-5423
- 486 Mavroidi A, Tsakris A, Tzouveleki LS et al Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. *J Antimicrob Chemother* 200; 46(6):1041– 1042
- 487 Pournaras S, Tsakris A, Maniatis AN et al. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):4026 –4028
- 488 Siarkou VI, Vitti D, Sofianou D et al Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1325–1330.
- 489 Karampatakis T, Geladari A, Tsakris A, Roilides E et al Cluster-distinguishing genotypic and phenotypic diversity of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in solid-organ transplantation patients: a comparative study. *J Med Microbiol.* 2017 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000541>
- 490 Geladari A, Karampatakis T, Tsakris A, Roilides E Epidemiological surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacteria in a solid organ transplantation department. *Transpl Infect Dis.* 2017 <https://doi.org/10.1111/tid.12686>
- 491 Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla_{CTX-M-2}, bla_{GES-1} and bla_{GES-5}, bla_{IMP-1} and bla_{SPM-1} causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infectious Diseases.* 2012;12:176. doi:10.1186/1471-2334-12-176.
- 492 Ellappan K, Narasimha H, Kumar S Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital in South India *J Global Antimicrob Resist*,2018;12:37-43493
493. Treepong P, Kos VN, Hocquet D et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone *Clin Microb Infect* 2008;24:258-266
- 494 Kotwal A, Biswas D, Kakati B, Singh M. ESBL and MBL in Cefepime Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: An Update from a Rural Area in Northern India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2016;10(4):DC09-DC11. doi:10.7860/JCDR/2016/18016.7612.
- 495 Oberoi L, Singh N, Sharma P, Aggarwal A. ESBL, MBL and Ampc β Lactamases Producing Superbugs – Havoc in the Intensive Care Units of Punjab India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2013;7(1):70-73. doi:10.7860/JCDR/2012/5016.2673.
- 496 Vardakas KZ, Tansarli GS, Falagas ME et al Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2793–2803. <https://doi.org/10.1093/jac/dks301>
497. Lee B, Kang SY, Choi EH et al. Outcome of antimicrobial therapy of pediatric urinary tract infections caused by extended-spectrum -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Infect Chemother* 2013;45:415–421. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.4.415>

- 498 Harris PN, Wei JY, Paterson DL et al Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bloodstream infections caused by Enterobacter, Citrobacter or Serratia species: a systematic review with meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:296–306. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv346>
- 499 Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151–6
- 500 Patel HB, Lusk KA, Cota JM. The Role of Cefepime in the Treatment of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Infections. . *J Pharm Pract.* 2017 1:897190017743134 doi: 10.1177/0897190017743134.
- 501 Reinert, RR, Low, DE, Rossi, F. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1018–1029.
502. Patrice Nordmann, Gaëlle Cuzon, Thierry Naas The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- producing bacteria *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–36
503. Luzzaro F, Docquier JD, Taniolo A et al . Emergence in *K. pneumoniae* and *E. cloacae* clinical isolates of the VIM-4 encoded by a conjugative plasmid *Antimicrob Agents Chemother* . 2004;48:648-650
- 504 Miriagou V, Tzelepi E, Tsouvelekis LS et al. *E. coli* with self transferable, multiresistance plasmid coding for MBL VIM-1 . *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47; 395-7
- 505 Nordmann K, Poirel L, Livermore DM et al . The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microb.* 2011;19(2): 588–595
- 506 Crowley B, Benedí VJ, Doménech-Sánchez A. Expression of SHV-2 β -Lactamase and of Reduced Amounts of OmpK36 Porin in *Klebsiella pneumoniae* Results in Increased Resistance to Cephalosporins and Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002;46(11):3679-3682. doi:10.1128/AAC.46.11.3679-3682.2002.
- 507 Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, et al. Roles of β -Lactamases and Porins in Activities of Carbapenems and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1999;43(7):1669-1673.
- 508 Poirel L, Héritier C, Tolün V et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22
- 509 Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace *Journal of Antimicrob Chemother.* 2012 ;67(7): 1597–1606
510. Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials . *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(2):465-475.
511. Psychogiou M, Tassios PT, Tzouvelekis LS et al . Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2008 ;61(1):59-63.

512. Πουλου Α, Μελά Σ et al ,Συχνότητα απομόνωσης στελεχών *Klebsiella pneumoniae* με παραγωγή καρβαπενεμασών στο Γ.Ν.Σερρών το διάστημα 2015-2017,Ανακοίνωση ΑΑ 58Γ , Πανελλήνιο συνέδριο Βιοπαθολογίας, Αθήνα 2018
513. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(4):1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
514. Bratu S, Landman D, Haag R et al .Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City A New Threat to Our Antibiotic Armamentarium *Arch Intern Med*. 2005;165(12):1430-1435. doi:10.1001/archinte.165.12.1430
515. Viau RA, Hujer AM, Marshall SH, et al. “Silent” Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Bearing *K. pneumoniae* Carbapenemase in a Long-term Care Facility for Children and Young Adults in Northeast Ohio. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(9):1314-1321. doi:10.1093/cid/cis036.
516. Endimiani A, DePasquale JM, Forero S, et al. Emergence of *bla*_{KPC}-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(5):1102-1110. doi:10.1093/jac/dkp327.
517. Castanheira M, Farrell SE, Jones RN et al. Prevalence of β -Lactamase-Encoding Genes among Enterobacteriaceae Bacteremia Isolates Collected in 26 U.S. Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(7):3012-3020. doi:10.1128/AAC.02252-12.
518. Chan WW, Peirano G, Smyth D J., Pitout JD. The characteristics of *Klebsiella pneumoniae* that produce KPC-2 imported from Greece *Diagn Microbiol Inf Dis* 2013; 75: 317-319
519. Virginia Villegas M, Lolans K, Correa A, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(8):2880-2882. doi:10.1128/AAC.00186-06.
520. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(1):333-334. doi:10.1128/AAC.00736-08.
521. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–2, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(7):1178-1180. doi:10.3201/eid1407.070826.
522. Wei Z-Q, Du X-X, Yu Y-S, Shen P, Chen Y-G, Li L-J. Plasmid-Mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from China . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(2):763-765.
523. Giani T, D’Andrea MM, Pecile P, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase . *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(11):3793-3794. doi:10.1128/JCM.01773-09
524. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa , Cantón R et al. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain . *J Antimicrob Chemother*, 2010;65(8) 65: 1608–1614

525. Naas T, Cuzon G, Gaillot O, Courcol R, Nordmann P. When Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC Meets *Escherichia coli* ST131 in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(10):4933-4934. doi:10.1128/AAC.00719-11.
526. Pournaras S, Protonotariou E, Tsakris A, Sofianou D et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64(2) : 348–352,
527. Mavroidi A, Miriagou V, Petinaki E et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2 β -lactamase. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 ;39(3):247-50.
528. Cagnacci S, Gualco L, Rossolini GM et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother*. 2008 ;61(2):296-300.
529. Aschbacher R, Pagani L, Livermore DM et al. Metallo- β -lactamases among Enterobacteriaceae from routine samples in an Italian tertiary-care hospital and long-term care facilities during 2008. *Clin Microbiol Infect*. 2011 ;17(2):181-9.
530. Tato M, Coque TM, Cantón R et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007 1;45(9):1171-8.
531. Miró E, Segura C, Navarro F, Salvadó M et al. Spread of plasmids containing the bla(VIM-1) and bla(CTX-M) genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2010 ;65(4):661-5
532. Kassis-Chikhani N, Decré D, Arlet G et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006 ;57(1):142-5.
533. Yildirim I, Ceyhan M, Gur D, Rossolini GM et al. First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother*. 2007 ;19(4):467-8.
534. Ktari S, Arlet G, Mnif B, et al. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(12):4198-4201.
535. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ et al. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2001 Dec;39(12):4433-9.
536. Ikonomidis A, Spanakis N, Tsakris A et al. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo-beta-lactamase and SHV-2a extended-spectrum beta-lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist*. 2007;13(4):221-6
537. Scoulica EV, Neonakis IK, Tselentis YJ et al. Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(3):167-72.

538. Nordmann P , Poirel L , Walsh TR et al. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*, 2011;66(4): 689–692
539. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Inf Dis* 2010;10(9):597-602.
540. Poirel L, Savov E, Nazli A, et al. Outbreak Caused by NDM-1- and RmtB-Producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(4):2472-2474.
541. Voulgari E, Gartzonika C, Tsakris A et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece *J Antimicrob Chemother*. 2014 ; 69(8):2091-7.
542. . Baraniak A, Izdebski R. ,Gniadkowski M et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012–14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases *J Antimicrob Chemother* ,2016 ;71 (1) : 85–91
543. Lascols C, Peirano G, Pitout JDD et al. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(1):130-136.
544. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H et al. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ;52: 2950-4
545. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, et al. First Clinical Cases of OXA-48-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the “Menace” Arrives in the New World. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(2):680-683. doi:10.1128/JCM.02580-12.
- 546 Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins *Infection*. 1989;17(5):316-21.
- 547 Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(11):2200-2209.
548. Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005 Dec;53(4):257-64
549. Smith Moland E, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of Newer β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from 24 U.S. Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):3837-3842.
550. Song W, Kim JS, Lee KM et al. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006 ;55(3):219-24.
551. Pai H, Kang C-I, Byeon J-H, et al. Epidemiology and Clinical Features of Bloodstream Infections Caused by AmpC-Type- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):3720-3728.

552. Woodford N, Reddy S, Livermore DM et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother.* 2007 ;59(1):102-5.
- 553 Oberoi L, Singh N, Sharma P, Aggarwal A. ESBL, MBL and Ampc β Lactamases Producing Superbugs – Havoc in the Intensive Care Units of Punjab India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR.* 2013;7(1):70-73. doi:10.7860/JCDR/2012/5016.2673.
- 554 Alonso N, Miró E. Coll P et al Molecular characterization of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in *Escherichia coli* clinical isolates *Int J Antimicrob Agents* 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.10.007>
555. Mata C, Miró E, Navarro F et al. Plasmid typing and genetic context of AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital 1999-2007. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jan;67(1):115-22
- 556 Arena F, Giani T, Becucci E, et al. Large Oligoclonal Outbreak Due to *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST26 Producing the FOX-7 AmpC β -Lactamase in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4067-4072.
557. Roh KH, Uh Y, Song W et al. First Outbreak of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Producing both SHV-12-Type Extended-Spectrum β -Lactamase and DHA-1-Type AmpC β -Lactamase at a Korean Hospital. *Yonsei Medical Journal.* 2008;49(1):53-57. doi:10.3349/ymj.2008.49.1.53.
558. Suh B, Bae IK, Lee K et al. Outbreak of Meropenem-Resistant *Serratia marcescens* Mediated by Chromosomal AmpC β -Lactamase Overproduction and Outer Membrane Protein Loss. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010;54(12):5057-5061. doi:10.1128/AAC.00768-10.
559. Zhang X, Lou D, Xu Y, et al. First identification of coexistence of bla_{NDM-1} and bla_{CMY-42} among *Escherichia coli* ST167 clinical isolates. *BMC Microbiology.* 2013;13:282.
560. Ktari S, Arlet G, Mnif B et al. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2006;50(12):4198-4201. doi:10.1128/AAC.00663-06.
561. Mansour W, Haenni M, Madec JY et al. Outbreak of colistin-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017 ;10:88-94
562. Richter SN, Frasson I, Franchin E, et al. 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 Pathogens.* 2012;4:7. doi:10.1186/1757-4749-4-7.
563. Mammina C, Aleo A, Nastasi A et al. Multiclonal emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Tuscany, Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 ;36(6):576-8.
564. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India *J Antimicrob Chemother* 2012;67(1):243–244
565. Seiffert SN, Marschall J, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 ;44(3):260-2.

566. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A et al. 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.
567. Oliver A, Mulet X, Juan C et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015 ;21-22:41-59. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.002
568. Juan C, Conejo MC, Oliver A et al. Challenges for accurate susceptibility testing, detection and interpretation of β -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a Spanish multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):619-30. doi: 10.1093/jac/dks439
569. Fajardo A, Hernando-Amado S, Martinez JL et al. Characterization of a novel Zn²⁺-dependent intrinsic imipenemase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2014 ;69(11):2972-8. doi: 10.1093/jac/dku267.
570. Viedma E, Juan C, Acosta J et al. Nosocomial Spread of Colistin-Only-Sensitive Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing the Extended-Spectrum β -Lactamases GES-1 and GES-5 in Spain . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2009;53(11):4930-4933. doi:10.1128/AAC.00900-09.
571. Morrissey I, Hackel M, Biedenbach D et al. A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. *Pharmaceuticals.* 2013;6(11):1335-1346. doi:10.3390/ph6111335.

IV. Δημοσιεύσεις

από την παρούσα διατριβή

1. Poulou A., Grivakou E., Vrioni G., Koumaki V., Pittaras T., Pournaras S., Tsakris A. Modified CLSI Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of ESBLs among Enterobacteriaceae Producing Various β -Lactamases. *J Clin Microbiol* ,2014; 52 (5), 1483–1489. <http://doi.org/10.1128/JCM.03361-13>
2. Poulou A, Grivakou E. Politi L, Dimitroulia E, Tsakris A. Performance of the modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for detecting ESBLs in *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 ; 90(1):70-71. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.006.