

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Σ. Λαδάς (από 1/9/2007 έως 31/8/2013)

Καθηγητής Π. Σφηκάκης (από 1/9/2013)

***«In vitro ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΜΕ ΜΕΡΟΠΕΝΕΜΗ,
ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ, ΓΕΝΤΑΜΙΚΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΜΥΚΙΝΗ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ:
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ 4 ΜΕΘΟΔΩΝ»***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Σ. Λαδάς (από 1/9/2007 έως 31/8/2013)

Καθηγητής Π. Σφηκάκης (από 1/9/2013)

***«In vitro ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗΣ ΜΕ ΜΕΡΟΠΕΝΕΜΗ,
ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ, ΓΕΝΤΑΜΙΚΙΝΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΜΥΚΙΝΗ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ:
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ 4 ΜΕΘΟΔΩΝ»***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

- Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 20/07/2012
- Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης διδακτορικής διατριβής: 14/07/2014
- Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} προόδου: 19/1/2015
- Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} προόδου: 3/2/2017
- Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} προόδου: 1/2/2019
- Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 13/12/2019

• Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Λεωνίδα Τζουβελέκης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Γεώργιος Δαΐκος, Ομότιμος Καθηγητής
3. Ελένη Γιαμαρέλλου, Ομότιμη Καθηγήτρια

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 ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΗΝΤΑΣ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, 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 ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ 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.

■

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΑΠΟΥΤΣΑΚΗ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης: 21-1-1971

Διεύθυνση οικίας: Βιτσίου 24^α, Μελίσσια, ΤΚ 15127

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 2108033525, 6974665254

Email: vassiliki.papoutsaki@gmail.com

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ

Ιατρός Βιοπαθολόγος

- Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας: Αρ. Πρ. 1251, 24/3/2004, Νομαρχία Αθηνών
- Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος: Αρ. Πρ. 14064, 3/8/1995, Νομαρχία Ηρακλείου

ΜΕΛΟΣ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

- Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών (ΑΜ: 044760)
- General Medical Council (Ιατρικός Σύλλογος Μ. Βρετανίας) (Ref No: 4325758)
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (Member ID: 132024)
- Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία
- Ελληνική Εταιρία Ιατρικής Μυκητολογίας

- Ελληνική Εταιρία Χημειοθεραπείας

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1982-1988: Πρότυπος Ευαγγελική Σχολή Σμύρνης. Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα
- 1989-1995: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης. Βαθμός Πτυχίου: Άριστα (8.60)
- 1997-1999: Εκπαίδευση για την ειδικότητα της Παθολογίας στη Μ. Βρετανία σε αναγνωρισμένες θέσεις εκπαίδευσης (official training posts) και στη Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»
- 1999-2003: Εκπαίδευση για την ειδικότητα της Ιατρικής Βιοπαθολογίας στα νοσοκομεία «Ο Ευαγγελισμός» και «Α. Συγγρός»
- 2014-σήμερα: Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 1995-1996: Υπηρεσία υπαίθρου με απόσπαση στη Μονάδα Τεχνητού Νεφρού του Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου «Βενιζέλειο-Πανάνειο»
- 1995-1996: Άμισθος Επιστημονικός Συνεργάτης της Κλινικής Παθολογικής Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ)
- 1997-1998: Senior House Officer in General Medicine στο νοσοκομείο «Watford General Hospital», West Hertfordshire Hospitals NHS Trust και Senior House Officer in Care of the Elderly στο νοσοκομείο “Queen Elizabeth the Queen Mother Hospital”, East Kent Hospitals University NHS Trust
- 1998-1999: Ειδικευόμενη ιατρός στη Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»
- 2000-2003: Ειδικευόμενη ιατρός στα Εργαστήρια των Νοσοκομείων «Ο Ευαγγελισμός» και «Α. Συγγρός»
- 2003-2005: Βιοπαθολόγος, Ιδιωτικό Διαγνωστικό Κέντρο «Euromedica»

•2005-σήμερα: Βιοπαθολόγος, Νοσοκομείο «ΥΓΕΙΑ»

ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

•Papoutsaki V, Galani I, Papadimitriou E, Karantani I, Karaikos I, Giamarellou H. Evaluation of *in vitro* methods for testing tigecycline combinations against carbapenemase-producing *K.pneumoniae* isolates. J Glob Antimicrob Resist. 2019; pii: S2213-7165(19)30194-8.

•Galani I, Karaikos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, Kazila P, Tsorlini H, Charalampaki N, Toutouza M, Vagiakou H, Pappas K, Kyratsa A, Kontopoulou K, Legga O, Petinaki E, Papadogeorgaki H, Chinou E, Souli M, Giamarellou H, On Behalf Of The Study Collaborators. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. Euro Surveill. 2018;23(31).

ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

•I. Galani, V. Papoutsaki, R. Karantani, I. Karaikos, L.Galani, P. Adamou, I. Deliolanis, A. Kodonaki, E.Papadogeorgaki, S. Maraki, M. Damala, E. Prifti, H. Vagiakou, E. Petinaki, K. Fountoulis, S. Tsiplakou, H. Kirikou, A. Antoniadou, H. Giamarellou. *In vitro* activity of ceftolozane-tazobactam alone, and in combination with amikacin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Greece. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, The Netherlands, April 2019

•N.Tsagarakis, A.Sideri, A. Triantafyllou, C. Nikolidaki, P. Makridis, V. Papoutsaki, N. Chaviaras, M. Nycha, A. Stamoulakatou, E. Papadogeorgaki. Age-related prevalence of common upper respiratory pathogens, based on the FilmArray respiratory panel. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienna, Austria, April 2017

•S. Maraki, V. Papaioannou, P. Kazila, H. Tsorlini, N. Charalampakis, M. Toutouza , H. Vagiakou , K. Pappas, A. Kyratsa, K. Kontopoulou, O. Legga, E. Petinaki,

E.Papadogeorgaki, E.Chinou, R. Karantani, V. Papoutsaki, I.Galani, H. Giamarellou. Recent epidemiological data on carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greek hospitals. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienna, Austria, April 2017

•V. Papoutsaki, R. Karantani, I. Galani, M. Souli, I. Karaiskos, E. Papadogeorgaki, H. Giamarellou. Interactions of tigecycline with colistin, gentamicin or meropenem against tigecycline resistant carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, The Netherlands, April 2016

•M. Souli, A. Argyropoulou, A. Charisiadou, G. Dalekos, L. Galani, I. Karatzoglou, L. Kondili, S. Maraki, E. Papadogeorgaki, A. Paschali, V. Papoutsaki, E. Perivolioti, E. Trika, S. Tsiplakou, E. Tsorlini, N. Vakalis, H. Giamarellou on behalf of the Hellenic SG on Staph.Infections. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals: the Hellenic study group on staphylococcal infections. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, April 2013

•V.Papoutsaki, I.Galani, M.Souli, L.Galani, N. Vakalis, H. Giamarellou. Evaluation of two Etest methodologies for the detection of synergistic interactions of tigecycline combinations against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K.pneumoniae*. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, April 2013

•Papoutsaki V, Lekakou D, Galani I, Souli M, L. Galani, Karaiskos I, Vakalis N, Giamarellou H. *In Vitro* Activities of tigecycline and tigecycline combinations against KPC-Producing *K.pneumoniae*: Comparison between the checkerboard and Etest methods. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco, USA, September 2012

ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

•«Δραστηκότητα της κεφτολοζάνης/ταζομπακτάμης και του συνδυασμού της με αμικασίνη έναντι πολυανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* στην Ελλάδα». Β.Παπουτσάκη, Ε.Γαλάνη, Ε.Καραντάνη, Η.Καραϊσκος, Λ.Γαλανή, Π.Αδάμου, Ι.Δεληολάνης, Α.Κωδωνάκη, Ε. Παπαδογεωργάκη, Σ.Μαράκη, Μ.Δαμαλά, Ε.Πρίφτη, Ε.Βαγιάκου, Ε. Πετεινάκη, Κ.Φουντούλης, Σ.Τσιπλάκου, Ε.Κηρύκου, Α. Αντωνιάδου, Ε.Γιαμαρέλλου. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα, Μάρτιος 2019

•«*Aerococcus urinae*: Ένα αναδυόμενο παθογόνο λοιμώξεων του ουροποιητικού». Χ. Νικολιδάκη, Α. Σιδέρη, Γ.Πλακιάς, Μ.Νυχά, Β.Παπουτσάκη, Α. Τριανταφύλλου, Ε. Παπαδογεωργάκη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

•«Υποξεία βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα από *Abiotrophia defectiva* σε ασθενή με συγγενή καρδιοπάθεια». Α. Σιδέρη, Χ. Νικολιδάκη, Ι.Παπαγιάννης, Μ.Νυχά, Β.Παπουτσάκη, Α. Τριανταφύλλου, Μ.Αγγελοπούλου, Γ.Πλακιάς, Π.Σταματέλος, Ι.Ζανόπουλος, Μ.Μαρκοπούλου, Σ.Αγαπάκης, Ε. Παπαδογεωργάκη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2019

•«Εργαστηριακή εκτίμηση της δραστηκότητας συνδυασμών τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες: σύγκριση των μεθόδων της καμπύλης θανάτωσης στο χρόνο και της κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικών (Etest)». Β.Παπουτσάκη, Ε.Καραντάνη, Ε.Γαλάνη, Ε. Παπαδογεωργάκη, Ε. Γιαμαρέλλου. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K.pneumoniae* που απομονώνονται στα ελληνικά νοσοκομεία». Η.

Καραϊσκος, Σ. Μαράκη, Β. Παπαϊωάννου, Π. Καζίλα, Ε.Τσορλίνη, Ν. Χαραλαμπάκη, Μ.Τούτουζα, Ε. Βαγιάκου, Κ. Παππάς, Α.Κυράτσα, Κ.Κοντοπούλου, Ο. Λέγγα, Ε.Πετεινάκη, Ε. Παπαδογεωργάκη, Ε. Χίνου, Ε. Καραντάνη, Β. Παπουτσάκη, Ε. Γαλάνη, Ε. Γιαμαρέλλου. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Αποτυχία εμβολίων PPSV23 και PCV13 έναντι του οροτύπου 3 του *Streptococcus pneumoniae* σε ενήλικα». Β. Παπουτσάκη, Φ.Βασιλαρά, Γ.Ποθητός, Χ.Νικολιδάκη, Α.Σιδέρη, Γ.Πλακιάς, Μ.Νυχά, Ν.Χαβιάρας, Ν. Τσαγκαράκης, Ε.Παπαδογεωργάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Περίπτωση εξωγενούς ενδοφθαλμίτιδας από *Fusarium sp* σε ανοσοεπαρκή ασθενή». Χ. Νικολιδάκη, Α. Σιδέρη, Μ.Νυχά, Β. Παπουτσάκη, Ν.Χαβιάρας, Ν. Τσαγκαράκης, Κ. Ισχυρίδης, Α. Παναγόπουλος, Γ. Πλακιάς, Α. Τριανταφύλλου, Ε. Παπαδογεωργάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Ταχεία διάγνωση ιογενούς μηνιγγίτιδος-εγκεφαλίτιδος από Human Parechovirus σε νεογνά». Α. Σιδέρη, Χ. Νικολιδάκη, Ν.Χαβιάρας, Β. Παπουτσάκη, Ν. Τσαγκαράκης, Α. Τριανταφύλλου, Γ.Πλακιάς, Ι. Ζαννόπουλος, Π.Σταματέλος, Μ. Νυχά, Μ.Τσαρτσάλη, Ε. Λαγκώνα, Β.Συριοπούλου, Μ. Σακλαμάκη, Ε. Παπαδογεωργάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Εκτίμηση του επιπολασμού κοινών παθογόνων του ανωτέρου αναπνευστικού ανά ηλικιακή ομάδα, με βάση το FILMARRAY». Ν. Τσαγκαράκης, Α. Σιδέρη, Α. Τριανταφύλλου, Χ. Νικολιδάκη, Π. Μακρίδης, Ν. Χαβιάρας, Β.Παπουτσάκη, Μ. Νυχά, Ι. Ζαννόπουλος, Δ. Γιαννακόπουλος, Ν. Νικολάου, Μ. Κωνσταντού, Ε. Στυλιανομανωλάκης, Ι. Φανιουδάκης, Α.Σταμουλακάτου, Ε. Παπαδογεωργάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Μάρτιος 2017

•«Αλληλεπιδράσεις της τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη, γενταμικίνη ή μεροπενέμη έναντι ανθεκτικών στην τιγκεκυκλίνη στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες». Β. Παπουτσάκη, Ε. Καραντάνη, Ε. Γαλάνη, Μ. Σουλής, Ε. Παπαδογεωργάκη, Η.Καραϊσκος, Ε. Γιαμαρέλλου. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα, Μάρτιος 2016

- «Εμπειρία MALDI-TOF MS σε νοσοκομειακό εργαστήριο». B. Παπουτσάκη, Γ. Πλακιάς, Χ. Νικολιδάκη, Α. Σιδέρη, Μ. Νυχά, Π. Σταματέλος, Σ. Δαλάκογλου, Ι. Ζαννόπουλος, Μ. Μαρκοπούλου, Ε. Καραντάνη, Ε. Παπαδογεωργάκη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, Ιούνιος 2016
- «Αποστήματα περιοχής κεφαλής-τραχήλου από *Eikenella corrodens*». B. Παπουτσάκη, Χ. Νικολιδάκη, Α. Σιδέρη, Γ. Πλακιάς, Μ. Νυχά, Ν. Χαβιάρας, Ε. Παπαδογεωργάκη. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, Ιούνιος 2016
- «Συγκριτική μελέτη της in vitro δραστηριότητας τετρακυκλίνης, μινοκυκλίνης και τιγκεκυκλίνης έναντι του *A.baumanii*». Ν Τσαγκαράκης, Δ. Λεκκάκου, Χ. Νικολιδάκη, B. Παπουτσάκη, Α.Σιδέρη, Α.Τριανταφύλλου, Χ Σαφιολέα. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2015
- «Διερεύνηση του προφίλ αντοχής του *A. baumanii* σε συνήθη αντιβιοτικά». Ν Τσαγκαράκης, Δ.Λεκκάκου, Χ.Νικολιδάκη, B.Παπουτσάκη, Α. Σιδέρη, Α.Τριανταφύλλου, Χ. Σαφιολέα. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2015
- «Ουρολοιμώξεις από *Salmonella sp*». Ν. Χαβιάρας, Α. Σιδέρη, Χ. Νικολιδάκη, B. Παπουτσάκη, Χ. Σαφιολέα 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2015
- «Οφθαλμική λοίμωξη από *Nocardia sp*», Χ. Νικολιδάκη, Ν. Χαβιάρας, Α. Σιδέρη, Μ. Νυχά, Α. Τριανταφύλλου, Σ. Δαλάκογλου, B. Παπουτσάκη, Χ. Σαφιολέα. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα, Φεβρουάριος 2015
- «Πανελλήνια μελέτη αντοχής στελεχών *Staphylococcus aureus* 2012». Μ. Σουλή, Α. Αργυροπούλου, Ν. Βακάλης, Λ. Γαλανή, Ε. Καραντάνη, Ι. Καρατζόγλου, Λ. Κονδύλη, Σ. Μαράκη, Γ. Νταλέκο, Ε. Παπαδογεωργάκη, B. Παπουτσάκη, Α. Πασχάλη, Ε. Περιβολιώτη, Ε. Τρίκα, Σ. Τσιπλάκου, Ε. Τσορλίνη, Α. Χαρισιάδου Ε. Γιαμαρέλλου. 39ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 2013 – Η Εργασία έλαβε το 1^ο Βραβείο του Αμφιαραείου Ιδρύματος Χημειοθεραπευτικών Μελετών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	15
---------------------------	----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ	18
---	-----------

1.1. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Α.....	20
----------------------------------	----

1.2. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Β.....	23
----------------------------------	----

1.3. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ D.....	25
----------------------------------	----

Κεφάλαιο 2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΤΑΞΕΩΝ

ΚΑΡΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΠΟΥ ΑΝΕΥΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ *K.pneumoniae*

2.1. ΔΙΕΘΝΩΣ.....	27
-------------------	----

2.2. Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	35
-----------------------------------	----

Κεφάλαιο 3. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *K. pneumoniae* ΠΟΥ

ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ-ΑΙΤΙΑ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ

ΔΥΣΚΟΛΙΩΝ

3.1. ΠΟΛΥΑΝΤΟΧΗ.....	40
----------------------	----

3.2. ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ.....	41
--	----

3.3. ΘΑΝΑΣΙΜΗ ΑΠΕΙΛΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΙΟ ΕΥΑΛΩΤΟΥΣ.....	43
--	----

3.4 ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ.....	44
--------------------	----

Κεφάλαιο 4. ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ.....	46
--	-----------

Κεφάλαιο 5. ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

5.1. Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΚΟΠΙΑ.....	51
----------------------------	----

5.2. Η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΣΚΟΠΙΑ - ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ <i>in vitro</i> ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	55
---	----

Κεφάλαιο 6. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

6.1. ΤΙΓΕΚΥΚΛΙΝΗ.....	59
6.2. ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ.....	61
6.3. ΓΕΝΤΑΜΙΚΙΝΗ.....	62
6.4. ΦΩΣΦΟΜΥΚΙΝΗ.....	63
6.5. ΜΕΡΟΠΕΝΕΜΗ.....	64

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	66
7.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ.....	66
7.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	68
7.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	
7.4.1. Ανίχνευση καρβαπενεμασών με τη μέθοδο της PCR.....	71
7.4.2. Ανίχνευση πλασμιδιακού γονιδίου <i>mcr</i> με τη μέθοδο της PCR.....	73
7.4.3. Επιδημιολογική τυποποίηση βακτηριακών στελεχών.....	73
7.5. ΜΕΛΕΤΗ <i>in vitro</i> ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ)	
7.5.1. Μέθοδος της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Time Kill Assay).....	74
7.5.2. Μέθοδος της «σκακιέρας» (Checkerboard).....	76
7.5.3. Μέθοδοι με τη χρήση ταινιών κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικών (Etest).....	78

7.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	80
Κεφάλαιο 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
8.1. Έλεγχος ευαισθησιών και φαινοτυπικός έλεγχος στελεχών.....	83
8.2. Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης.....	87
8.3. Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης.....	94
8.4. Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης.....	97
8.5. Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης.....	99
8.6. Μελέτη βακτηριοκτόνου δράσης συνδυασμών.....	102
8.7. Συνολικά αποτελέσματα μελέτης συνέργειας - βακτηριοκτονίας αντιμικροβιακών και συνδυασμών τους.....	106
8.8. Συμφωνία μεταξύ των μεθόδων μελέτης συνέργειας.....	109
Κεφάλαιο 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
Κεφάλαιο 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	126
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	127
SUMMARY.....	131
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	132
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	135
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην εποχή της απειλητικής για τη δημόσια υγεία αντιμικροβιακής αντοχής, η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών αντιβιοτικών όσο και η συνετή χρησιμοποίηση όσων έχουν παραμείνει δραστικά, αποτελούν επιτακτικές ανάγκες. Στα πλαίσια της προσπάθειας αντιμετώπισης λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, είναι συχνή η εφαρμογή συνδυασμού αντιβιοτικών που μπορεί να δείχνουν κάποια δραστικότητα, όπως της κολιστίνης, τιγκεκυκλίνης, γενταμικίνης, φωσφομυκίνης ή ακόμη και μεροπενέμης. Θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο στον κλινικό ιατρό να γνωρίζει πιθανή συνεργική δράση τέτοιων συνδυασμών, και μάλιστα σε περιπτώσεις που αυτή αντιπροσωπεύει τη μοναδική ελπίδα θεραπείας, όπως σε λοιμώξεις από παν-ανθεκτικά παθογόνα.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι μελέτης συνέργειας αντιβιοτικών της Καμύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (Time Kill Assay) και της Σκακιέρας (Checkerboard) είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιηθείσες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, όμως είναι ακατάλληλες για καθημερινή χρήση στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο. Θα ήταν χρήσιμο να βρεθεί μια άλλη μέθοδος, ακριβής, αξιόπιστη, αλλά ταυτόχρονα εφαρμόσιμη σε ένα κοινό εργαστήριο. Η παρούσα μελέτη καταγίνεται με τη διερεύνηση του κατά πόσον κάποια από τρεις διαφορετικές μεθοδολογίες, στηριζόμενες στη χρήση των ταινιών κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικών (Etest), θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρόσφορη εναλλακτική λύση. Προς τούτο, έγινε σύγκριση των μεθοδολογιών αυτών με τις δύο προαναφερθείσες (Καμύλης Θανάτωσης στο Χρόνο και Σκακιέρας) κατά την εκτίμηση συνδυασμών τιγκεκυκλίνης με είτε κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη, έναντι κλινικών στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες διαφόρων τύπων, με σκοπό να διαπιστωθεί εάν μπορούν να αποτελέσουν μια αξιόπιστη εναλλακτική λύση στο πρόβλημα της αναζήτησης συνέργειας αντιμικροβιακών φαρμάκων για τη θεραπεία δύσκολων λοιμώξεων από τέτοια στελέχη.

Το πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης εκπονήθηκε στα εργαστήρια: α) Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών «Γ. Κ. Δαΐκος», β) Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ' Παθολογικής

Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αττικών» και γ) Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων Νοσοκομείου «Υγεία».

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε χάρη στην πολύτιμη συμβολή των αξιοτίμων μελών της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και σεβαστών Πανεπιστημιακών Δασκάλων, στους οποίους και απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες:

- Την Ομότιμη Καθηγήτρια Κα Ελένη Γιαμαρέλλου, η οποία ασχολήθηκε με το αντικείμενο της παρούσας μελέτης και μου μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις και τους πρωτοπόρους προβληματισμούς της, μεταδίδοντάς μου ταυτόχρονα την επιστημονική αγωνία της για τους ασθενείς που πάσχουν από σοβαρές λοιμώξεις, μιας αγωνίας που έχει εξάλλου αποτελέσει άξονα της προσφοράς της στη λοιμωξιολογία και το κοινωνικό σύνολο γενικότερα

- Τον Ομότιμο Καθηγητή Κο Γεώργιο Δαΐκο, ο οποίος μου προσέφερε αφειδώς αναγκαίο εργαστηριακό υλικό, όπως κλινικά στελέχη ασθενών για τη συλλογή των οποίων μερίμνησε προσωπικώς, ενώ απετέλεσε πολύτιμη πηγή γνώσης, απόσταγμα πολυετούς έρευνας στο χώρο των πολυανθεκτικών λοιμώξεων

- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κο Λεωνίδα Τζουβελέκη, ο οποίος καθοδήγησε το εργαστηριακό μέρος του πονήματος, δανείζοντάς μου την κριτική και εμπειριστατωμένη ματιά του στη μικροβιακή αντοχή και τους μηχανισμούς της και δίνοντάς μου το στίγμα της σύγχρονης κλινικής μικροβιολογίας.

Επιπλέον, απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου στο πρόσωπο της μοριακής βιολόγου Κας Ειρήνης Γαλάνη, μέλους του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού της Ιατρικής Σχολής και Υπευθύνου του Ερευνητικού Εργαστηρίου Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Θεραπείας της Δ΄ Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε στον τομέα της ειδικότητός της, αλλά και το πνεύμα της σύγχρονης επιστημονικής αντίληψης, το εξαιρετικό εκπαιδευτικό ταλέντο και το λαμπρό μυαλό που είχα την τύχη να γνωρίσω δουλεύοντας μαζί της.

Τέλος, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην τεχνολόγο του Ερευνητικού Εργαστηρίου Λοιμώξεων του Θεραπευτηρίου «Υγεία» κα Ειρήνη Καραντάνη, για τη βοήθεια και την εξαιρετική συνεργασία της.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά αποτελεί μια από τις σημαντικότερες απειλές για τη δημόσια υγεία, που σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας «απαιτεί δράση από όλους τους κυβερνητικούς τομείς και την κοινωνία» (WHO 2018). Ειδικότερα, η αντοχή των εντεροβακτηριακών στις καρβαπενέμες σχετίζεται με υψηλή θνητότητα εξαιτίας λοιμώξεων από τα μικρόβια αυτά ενώ εμφανίζεται σε απειλητικά αυξανόμενη συχνότητα διεθνώς (ECDCa, CDCa).

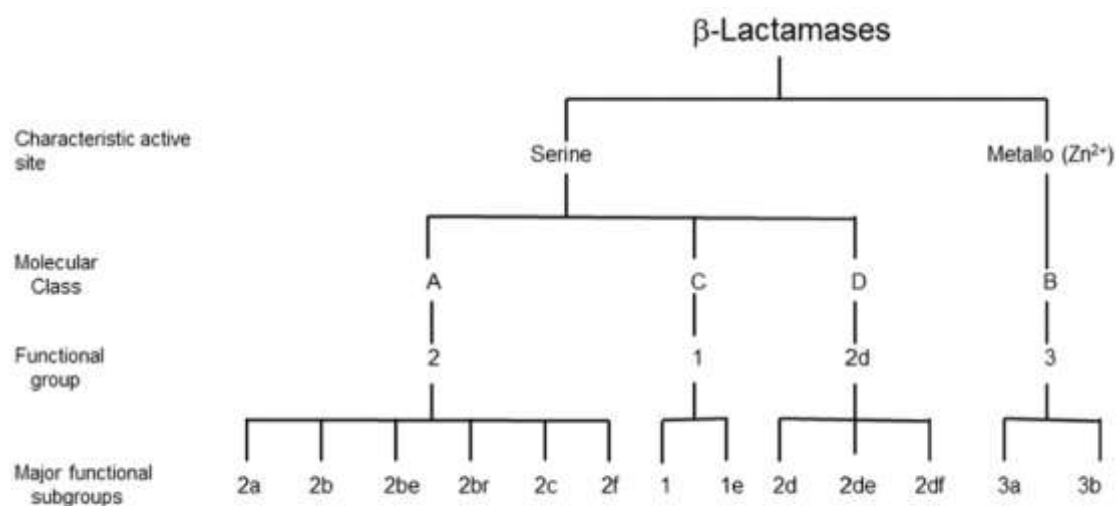
Η αντοχή στις καρβαπενέμες στα gram-αρνητικά βακτήρια μπορεί να οφείλεται σε κάποιον ή συνύπαρξη κάποιων από τους εξής μηχανισμούς: μεταλλαγμένες πενικιλλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), μεταλλαγμένες πορίνες εισόδου στο μικροβιακό κύτταρο σε συνδυασμό με παρουσία λακταμασών τύπου ESBL ή AmpC, ενεργοποίηση αντλιών εξόδου (efflux pumps) και παραγωγή καρβαπενεμασών (Patel & Bonomo 2013). Οι καρβαπενεμάσες αποτελούν το βασικό μηχανισμό αντοχής για τα εντεροβακτηριακά.

Οι καρβαπενεμάσες εκπροσωπούν την πιο ποικιλόμορφη οικογένεια β λακταμασών, με ένα εύρος φάσματος που ξεπερνά όλες τις υπόλοιπες (Queenan & Bush 2007). Παρ'ότι είναι γνωστές ως «καρβαπενεμάσες», πολλές από αυτές αναγνωρίζουν όλες τις β λακτάμες, ενώ είναι ανθεκτικές στους περισσότερους αναστολείς. Μέχρι τη δεκαετία του 1990 όλες οι καρβαπενεμάσες ήταν ειδικές για κάθε μικροβιακό είδος και κωδικοποιούνταν από χρωμοσώματα. Αυτό άλλαξε με την ανακάλυψη καρβαπενεμασών που κωδικοποιούνταν από πλασμίδια: της IMP-1, μιας μεταλλο-β λακταμάσης σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe et al. 1991) και της KPC-1, μιας καρβαπενεμάσης τάξεως A σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* (Yigit et al. 2001). Αυτό σήμαινε ότι τώρα μπορούσε να γίνει διασπορά των ενζύμων αυτών μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Ταξινόμηση καρβαπενεμασών

Οι καρβαπενεμάσες χωρίζονται, όπως και όλες οι β-λακταμάσες, σε δύο ευρείες κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό με τον οποίο προκαλούν υδρόλυση, με παρουσία στο ενεργό κέντρο τους είτε σερίνης είτε ιόντων ψευδαργύρου (μεταλλο-β-λακταμάσες) (Σχήμα 1.1). Με βάση τη μοριακή τους δομή ταξινομούνται σε τρεις τάξεις: A, B και D. (Ambler 1980). Οι τάξεις A και D υδρολύουν τα υποστρώματά

τους χρησιμοποιώντας σερίνη στο ενεργό κέντρο τους, ενώ η τάξη B είναι μεταλλο-λακταμάσες (Bush & Fisher 2011). Παράλληλα, έχει γίνει και λειτουργική ταξινόμησή τους με βάση τα χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων και των αναστολέων τους (Bush & Jacoby 2010). Έτσι, η τάξη A κατά Ambler αντιστοιχεί στη λειτουργική τάξη 2f, η τάξη B στη λειτουργική τάξη 3 και η τάξη D στην 2d (Πίνακας 1.1).



Σχήμα 1.1. Μοριακές και λειτουργικές συσχετίσεις β-λακταμασών (από Bush 2018).

Πίνακας 1.1. Συνήθεις τάξεις καρβαπενεμασών στα Εντεροβακτηριακά				
Τάξη κατά Ambler	Λειτουργική τάξη (Bush & Jacoby)	Ενεργό κέντρο	Βασικά χαρακτηριστικά	Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι
A	2f	Σερίνη	Υδρόλυση καρβαπενεμών, οξυιμινο-β-λακταμών, κεφαμυσινών	KPC-2, IMI-1, SME-1, GES-5
B	3	Ψευδάργυρος	Ευρεία υδρόλυση λακταμών αλλά όχι μονοπακταμών	VIM-1, IMP-1, NDM
D	2df	Σερίνη	Υδρόλυση οξασιλλίνης & καρβαπενεμών	OXA-23, OXA-48

Προσαρμοσμένο από Bush & Jacoby 2010.

Καρβαπενεμάσες τάξης A κατά Ambler / ομάδα 2f κατά Bush/Jacoby:

Περιλαμβάνει μια πλειάδα καρβαπενεμασών:

A) *χρωμοσωμικές, όπως :*

*οι NmcA (non-metallo-carbapenemases-A) : οι πρώτες που ταυτοποιήθηκαν (από στέλεχος *Enterobacter cloacae* το 1993) (Naas et al. 1994). Ήταν και παραμένουν σπάνιες.

*οι SME (*Serratia marcescens* enzymes). Αναγνωρίστηκαν αρχικά σε στέλεχος *Serratia marcescens* στο Λονδίνο το 1982 (Yang et al. 1990). Έκτοτε έχουν αναγνωριστεί 5 τύποι (Sme 1-5) και εμφανίζονται σποραδικά σε ΗΠΑ και Καναδά (Queenan et al. 2000, Poirel et al 2007a).

*η IMI-1 (Imipenem resistant): απομονώθηκε αρχικά από στέλεχος *Enterobacter cloacae* (Rasmussen et al. 1996). Έκτοτε υπάρχουν αναφορές ανίχνευσής της από τις ΗΠΑ, Γαλλία, Κροατία, Φινλανδία, Αργεντινή και Ιρλανδία (Naas et al. 2012, Bejuk et al. 2013, Osterblad et al. 2012, Radice et al. 2004, Boo et al. 2013).

*η SFC-1 (*Serratia fonticola* carbapenemase): απομονώθηκε από περιβαλλοντικά στελέχη (Henriques et al. 2004).

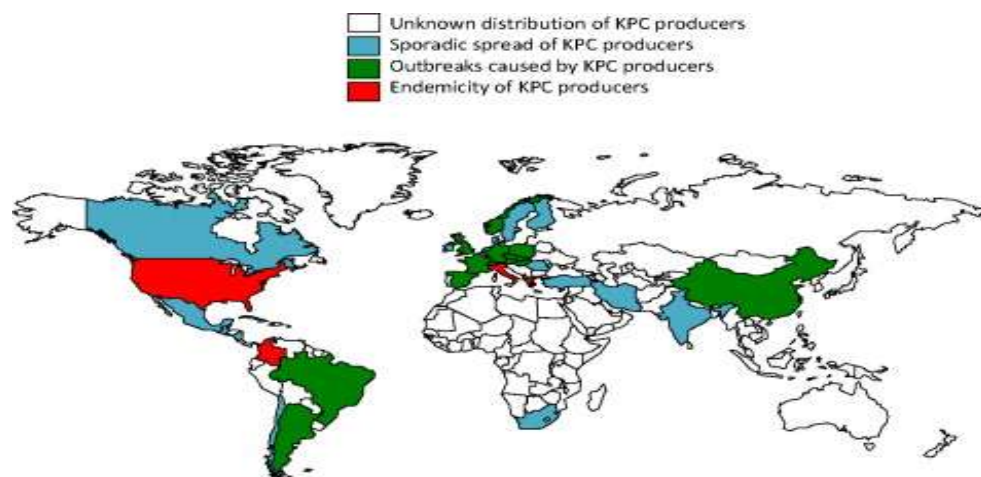
*η BIC-1 : απομονώθηκε επίσης από περιβαλλοντικά στελέχη *P. fluorescens* (Girlich et al. 2010).

B) *πλασμιδιακές, όπως:*

*οι GES (Guiana Extended Spectrum) : Η οικογένεια των λακταμασών GES περιλαμβάνει 24 μέλη (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#>). Παρ'ότι είναι σπάνιες, έχουν διασπαρεί σε όλον τον κόσμο. Ενώ όλες υδρολύουν ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες, αρκετές από αυτές παρουσιάζουν δράση καρβαπενεμάσης, όπως οι GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14, GES-18) (Nordmann & Poirel 2014).

*η IMI-2: εδρεύει σε πλασμίδιο και βρέθηκε σε περιβαλλοντικό στέλεχος *Enterobacter absuriae* στις ΗΠΑ (Aubron et al. 2005) και σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Κίνα (Yu et al. 2006).

*οι KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases): αποτελούν το σημαντικότερο και συχνότερο είδος της τάξεως A. Έχουν κυρίως ανιχνευθεί σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, που αποτελεί σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο, και παρέχουν υψηλά επίπεδα αντοχής όχι μόνο στις καρβαπενέμες αλλά και όλες τις β-λακτάμες. Έχουν επίσης ανιχνευθεί σε άλλα είδη εντεροβακτηριακών, καθώς και σε *Pseudomonas sp.* και *A.baumannii* (Patel & Bonomo 2013). Η πρώτη KPC (KPC-1, που αργότερα βρέθηκε ότι ταυτίζεται με την KPC-2), ανιχνεύθηκε στις ΗΠΑ το 1996 (Yigit et al. 2001). Από τότε έχουν ανιχνευθεί και άλλοι τύποι (24 έως σήμερα), όλοι προερχόμενοι από σημειακές μεταλλάξεις μιας κοινής αμινοξικής αλληλουχίας, με την KPC-2 να παραμένει η συχνότερη. Οι καρβαπενεμάσες αυτές έχουν διασπαρεί σε όλον τον πλανήτη (Εικόνα 1.1). Πλέον ενδημούν σε περιοχές της Λατινικής Αμερικής (Κολομβία, Αργεντινή) (Munoz-price et al. 2013), το Ισραήλ (Samra et al. 2007, Navon-Venezia et al. 2006) την Ελλάδα και την Ιταλία (Canton et al. 2012).



Εικόνα 1.1. Γεωγραφική κατανομή των KPC καρβαπενεμασών (KPC producers) (Nordmann & Poirel 2014).

Μπλε: σποραδική κατανομή

Πράσινο: Επιδημικές εξάρσεις

Κόκκινο: Ενδημικές περιοχές

Το γονίδιο *bla*_{KPC} μεταφέρεται σε πλασμίδια διαφόρων μεγεθών που κουβαλούν πολλά πρόσθετα γονίδια που παρέχουν αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών (κινολόνες, αμινογλυκοσίδες), περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές έναντι των

στελεχών που τα φέρουν (Endimiani et al. 2008), ενώ σπανίως έχει ανευρεθεί σε χρωμοσωμική θέση (Castanheira et al. 2009).

Μελέτες Ηλεκτροφόρησης Παλλομένου Πεδίου (PFGE) και Πολυτοπικής Τυποποίησης Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing-MLST) έδειξαν ότι ένας συγκεκριμένος κλώνος, ο ST 258, προεξάρχει διεθνώς (Kitchel et al. 2009). Ωστόσο έχουν βρεθεί και άλλοι κλώνοι δεικνύοντας πιο πολύπλοκα σχήματα εξάπλωσης αυτού του μηχανισμού αντοχής (Giakkoupi et al. 2011).

Η παραγωγή καρβαπενεμάσης τύπου KPC οδηγεί σε διαφόρους βαθμούς αντοχής με MICs που κυμαίνονται από τα ευαίσθητα όρια έως και >16 µg/ml (Patel & Bonomo 2013). Οι υψηλότερες MIC βρέθηκαν σε στελέχη που είχαν ταυτόχρονα απώλεια πορίνης (Omp K35/Omp 36) ή παρουσίαζαν αυξημένη παραγωγή καρβαπενεμάσης λόγω αυξημένου αριθμού αντιγράφων γονιδίου *bla*_{KPC} (Kitchel et al. 2010).

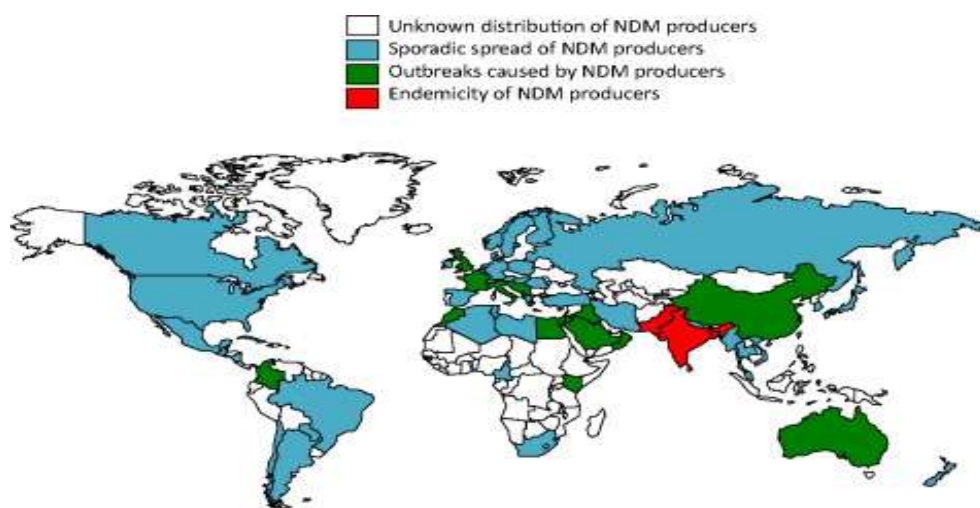
Καρβαπενεμάσες τάξης B κατά Ambler / ομάδα 3 κατά Bush/Jacoby: (μεταλλο-β-λακταμάσες)

Οι χρωμοσωμικές MBLs ήταν οι πρώτες που περιγράφησαν και αποτελούν την αιτία της αντοχής στις καρβαπενέμες των *Aeromonas* και *Stenotrophomonas sp* (Walsh et al. 2005). Οι πλέον επικίνδυνες όμως είναι οι πλασμιδιακές, και συνεπώς «κινητές» MBLs που άρχισαν να ανιχνεύονται από τη δεκαετία του 90, πρώτα σε στελέχη *P. aeruginosa* και σε αυξανόμενο ρυθμό σε εντεροβακτηριακά. (Patel et al. 2013).

Οι κυριότερες καρβαπενεμάσες της κατηγορίας αυτής είναι οι τύποι IMP, VIM και NDM (Walsh et al. 2005). Οι IMP ήσαν οι πρώτες που περιγράφησαν (Ito et al. 1995), ενώ έκτοτε έχουν καταγραφεί 53 ένζυμα στην ομάδα αυτή (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#>). Έχουν διασπαρεί διεθνώς αλλά ενδημούν στην Ασία (Ιαπωνία, Κίνα, Ταϊβάν). Οι VIM (Verona Integron - encoded MBLs) πρωτοπεριγράφησαν στην Ιταλία το 1997 (Cornaglia et al. 2000). Σήμερα αριθμούν 46 μέλη που έχουν ανιχνευθεί κυρίως στην *P. aeruginosa* αλλά και σε εντεροβακτηριοειδή. Η VIM-2 είναι αυτή που απαντάται συχνότερα (Poirel et al. 2007b), με ενδημική παρουσία στη Νότια Ευρώπη (Ελλάς, Ιταλία, Ισπανία). Η χώρα μας είναι γνωστή για την υψηλή επίπτωση στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν VIM-1 (Psychogiou et al. 2008), ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία των ενζύμων αυτών και σε άλλα εντεροβακτηριακά (Miriagou et al. 2008).

Ο τύπος NDM (New Delhi metallo-b-lactamase) πρωτοπεριγράφηκε το 2009 στη Σουηδία σε ασθενή που είχε νοσηλευτεί στην Ινδία (Yong et al. 2009, Nordmann et al. 2011a). Υπάρχουν επιδημιολογικές αναφορές που συνδέουν τις NDM με την Ινδία (Kumarasamy et al. 2010, Castanheira et al. 2011), αλλά, παρά τις αρχικές διαφωνίες, και με τα Βαλκάνια (Livermore et al. 2011) (Εικόνα 1.2). Μεγάλη ανησυχία προκάλεσαν καταγραφές παρουσίας των ενζύμων αυτών χωρίς προηγούμενη επαφή με υπηρεσίες υγείας (Kumarasamy et al. 2010), ενώ έλεγχος του δικτύου ύδρευσης της Ινδίας έδειξε ότι η έκθεση στις NDM ενδέχεται να είναι περιβαλλοντική (Walsh et al. 2011). Η ικανότητά τους να διασπείρονται ανάμεσα στα διάφορα μικροβιακά είδη είναι εντυπωσιακή, καθώς έχουν βρεθεί σε εντεροβακτηριακά καθώς και σε *P. aeruginosa* και *Acinetobacter sp*, (Nordmann 2014) ενώ περιγράφηκε και βακτηριαμμία από *Vibrio cholerae* που έφερε NDM σε

ασθενή που είχε νοσηλευτεί στην Ινδία (Darley et al 2012). Ως σήμερα έχουν περιγραφεί 16 τύποι. Ο NDM-1 είναι ο επικρατών. Έχει μικρή αμινοξική ομοιότητα με άλλες MBLs, δείχνοντας τη μεγαλύτερη με τις VIM1/2. Η σύνδεση με τις καρβαπενέμες δεν είναι τόσο ισχυρή όσο με άλλες MBLs, όμως ο ρυθμός υδρόλυσης φαίνεται να είναι ο ίδιος. Ανάλυση προτύπων αντοχής έδειξε τη συστηματική σύνδεσή τους με άλλες παραμέτρους αντοχής, όπως κεφαλοσπορινάσες τύπου AmpC και ESBLs καθώς και ένζυμα αντοχής σε αμινογλυκοσίδες και άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών (Nordmann & Poirel 2014).



Εικόνα 1.2. Γεωγραφική κατανομή των NDM καρβαπενεμασών (NDM producers) (Nordmann & Poirel 2014)

Μπλε: σποραδική κατανομή

Πράσινο: Επιδημικές εξάρσεις

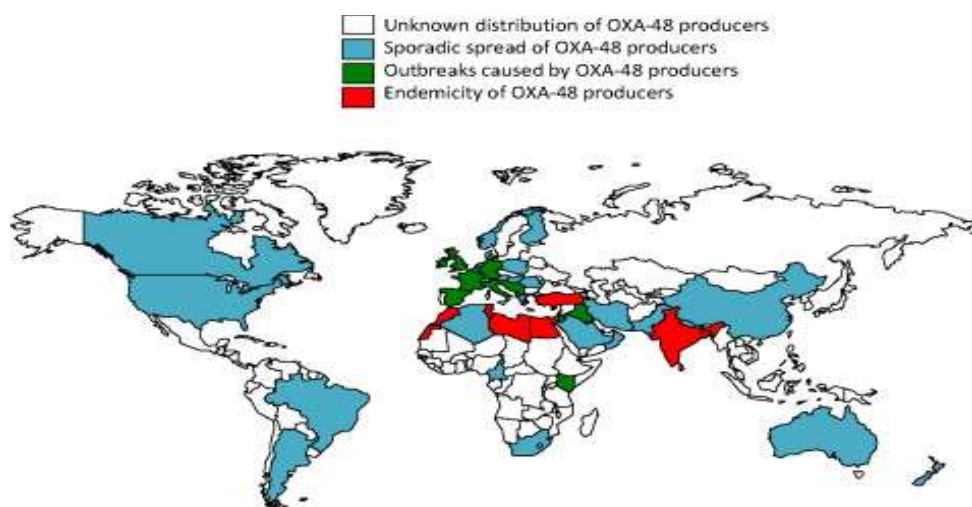
Κόκκινο: Ενδημικές περιοχές

Οι MBLs αναστέλλονται από το EDTA αλλά όχι από το κλαβουλανικό οξύ ή άλλους εμπορικά διαθέσιμους αναστολείς. Η ευαισθησία τους στις μονομπακτάμες διατηρείται εφόσον δεν συνυπάρχουν άλλοι μηχανισμοί αντοχής, όπως παραγωγή ESBLs.

Καρβαπενεμάσες τάξης D κατά Ambler / ομάδα 2d κατά Bush/Jacoby:

Οι β-λακταμάσες μοριακής τάξης D αποτελούν μια ετερογενή ομάδα που υδρολύουν αμινο- και καρβοξυ-πενικιλίνες (Poirel et al. 2010) και που σήμερα αριθμούν 498 μέλη (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#>). Από αυτά μόνο μερικά έχουν δραστηριότητα καρβαπενεμάσης (carbapenem hydrolyzing class D lactamases- CHDLs). Οι CHDLs υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες β' και γ' γενεάς και συνδυασμούς β-λακταμών με αναστολείς, όχι όμως και κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος, ενώ και η δράση τους έναντι των καρβαπενεμών είναι ασθενής. Για να αποκτήσουν υψηλότερα επίπεδα αντοχής απαιτούνται πρόσθετοι μηχανισμοί, όπως αλλαγές σε πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (πχ CarO, OmpK36) (Perez et al. 2007, Gulmez et al. 2008, Pfeifer et al. 2012), αυξημένο αριθμό αντιγράφων ή ενισχυμένο μηχανισμό efflux (Poirel et al. 2006).

Παρ'ότι οι περισσότερες CHDLs έχουν ανιχνευθεί σε στελέχη *Acinetobacter*, η OXA-48 και τα παράγωγά της ανιχνεύονται σε εντεροβακτηριακά (Poirel et al. 2012b). Η πρώτη OXA-48 περιγράφηκε στην Τουρκία το 2003 (Poirel et al. 2004). Στη χώρα αυτή παρατηρήθηκαν πολλές νοσοκομειακές εξάρσεις. Έκτοτε υπήρξε διασπορά σε όλη την Ευρώπη, κυρίως τη Νότια, καθώς και τη λεκάνη της Μεσογείου (Poirel et al. 2012b). Μια από τις αιτίες της επιτυχούς εξάπλωσης του γονιδίου *bla*_{OXA-48} είναι η μεγάλη ικανότητα μετακίνησης του πλασμιδίου όπου εδρεύει (Poirel et al. 2012a), και μάλιστα σε οποιοδήποτε εντεροβακτηριακό είδος (Potron et al. 2014). Παρουσία της OXA-48 έχει καταγραφεί στη Μέση Ανατολή, τη Βόρεια και τη Νότια Αφρική και το Ισραήλ, ενώ ένα παράγωγό της με μια σημειακή μετάλλαξη, η OXA-181, βρέθηκε στην Ινδία (Nordmann & Poirel 2014) (Εικόνα 1.3). Άλλα παράγωγα είναι η OXA-204, με δύο σημειακές μεταλλάξεις της OXA-48, η οποία ανευρέθη στη Β. Αφρική, και η OXA-232 με πέντε αμινοξικές μεταλλάξεις σε σχέση με την OXA-48. Αυτή βρέθηκε στις ΗΠΑ, σε ασθενή που είχε έρθει από την Ινδία, και μάλιστα βρέθηκε να συνυπάρχει με NDM-1. (Doi et al. 2014). Τέλος, ένα άλλο παρόμοιο ένζυμο, η OXA-163, ανιχνεύθηκε στην Αργεντινή (Poirel et al. 2011). Η OXA-163 διαφέρει από την OXA-48 κατά μία αντικατάσταση και τέσσερις ελλείψεις αμινοξέων. Παρ'ότι έχει ασθενέστερη αντικαρβαπενεμική δράση από την OXA-48, το φάσμα της περιλαμβάνει και τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος, με αποτέλεσμα να έχει δράση που ομοιάζει πολύ με αυτήν μιας ESBL (Poirel et al. 2011).



Εικόνα 1.3. Γεωγραφική κατανομή των OXA-48 καρβαπενεμασών (OXA-48 producers) (Nordmann & Poirel 2014)

Μπλε: σποραδική κατανομή

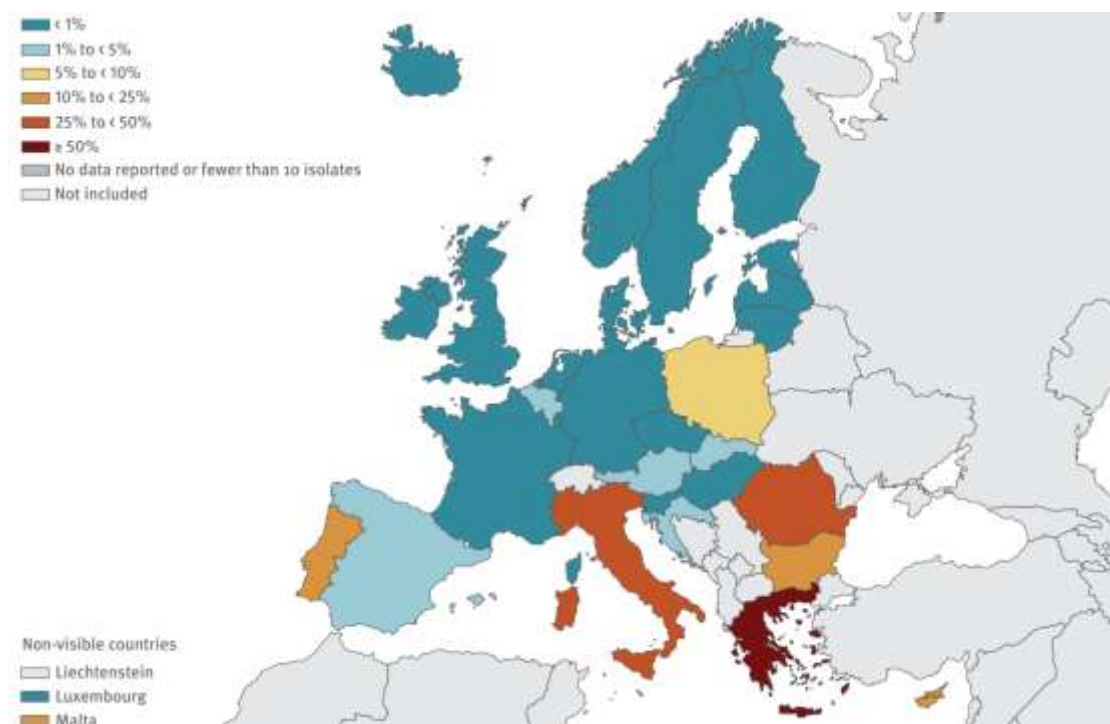
Πράσινο: Επιδημικές εξάρσεις

Κόκκινο: Ενδημικές περιοχές

Κεφάλαιο 2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΤΑΞΕΩΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΠΟΥ ΑΝΕΥΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ *K. pneumoniae*

2.1 ΔΙΕΘΝΩΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHOa) την τελευταία δεκαετία παρατηρήθηκε ανησυχητική παγκόσμια αύξηση στην επίπτωση και τον επιπολασμό των στελεχών *K. pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες. Στην Ευρώπη, το σταθμισμένο βάσει του πληθυσμού μέσο ποσοστό των στελεχών αυτών ήταν 7.5% για το 2018 (ECDCb). Η πιο επιβαρυνμένη χώρα ήταν η Ελλάδα με ποσοστό αντοχής των διεισδυτικών στελεχών *K. pneumoniae* στις καρβαπενέμες 63.9% και ακολουθούν η Ρουμανία με 29.5%, η Ιταλία με 26.8%, η Κύπρος με 21.8% και η Βουλγαρία με 21.2% (ECDCb) (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. *Klebsiella pneumoniae*. Ποσοστό (%) διεισδυτικών στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες κατά χώρα στην Ευρωπαϊκή Ένωση (πηγή: EARSNET, 2018).

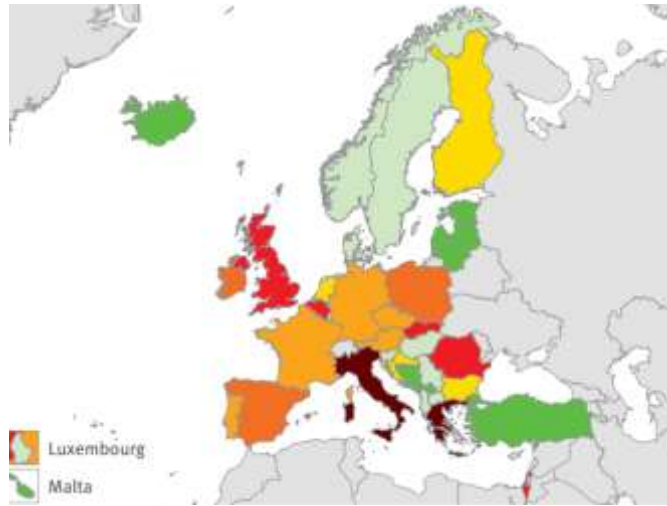
Στις ΗΠΑ, το 7.9% των διεισδυτικών στελεχών *K. pneumoniae* που καταγράφηκαν από το National Healthcare Safety Network ήταν ανθεκτικό στις καρβαπενέμες το

2014 (WHOa), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για στελέχη *Klebsiella sp.* που προκάλεσαν νοσοκομειακές λοιμώξεις αυξήθηκε από 1.6% το 2001 σε 10.4% το 2011 (CDCb). Σύμφωνα με τα στοιχεία του ΠΟΥ από το 2014, αντοχή σε στελέχη *K. pneumoniae* δηλώθηκε από όλες τις περιοχές μελέτης, αν και μόνο το 37% των Χωρών Μελών ήταν σε θέση να προμηθεύσουν πληροφοριακό υλικό (WHOb).

A) KPCs

Η 1^η KPC ανακαλύφθηκε το 1996 σε ασθενή από νοσοκομείο της Β. Καρολίνας των ΗΠΑ (Yigit et al. 2001). Αυτή η πρώτη περιγραφή ακολουθήθηκε από μεγάλο αριθμό αναφορών στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC (KPC producing *K. pneumoniae* -KPC_{Kp}) από την περιοχή της Ν. Υόρκης (Munoz-Price et al.2013). Το 2006 η επίπτωση του *bla*_{KPC} σε στελέχη *K. pneumoniae* στην περιοχή αυτή έφτασε το 36%, ενώ ακολούθησε πτώση τα επόμενα χρόνια, ώστε η επίπτωση να μειωθεί στο 13% το 2014 ((Abdalah et al. 2016). Πρόσφατες εκτιμήσεις έχουν εντοπίσει KPC_{Kp} σε όλες τις πολιτείες των ΗΠΑ (CDCc).

Τα KPC_{Kp} έχουν εξαπλωθεί στην Κεντρική και Νότια Αμερική, όπως στην Κολομβία (Cuzon et al. 2013), Αργεντινή, Γουατεμάλα, Μεξικό, Βενεζουέλα, Περού και Εκουαδόρ (Villegas et al. 2016). Στην Ευρώπη, οι χώρες με τη μεγαλύτερη εξάπλωση KPC_{Kp} είναι η Ελλάδα και η Ιταλία, όπου η κατάσταση το 2015 περιγραφόταν ως ενδημική (Albiger et al. 2015) (Εικόνα 2.2). Στο Ισραήλ, μετά από μεγάλη επιδημία KPC_{Kp} από το 2005 ως το 2007 με υπεύθυνο τον κλώνο ST258 (Marchaim et al. 2008), έγινε επιτυχής εθνική παρέμβαση με αποτέλεσμα μεγάλη μείωση της επίπτωσης των KPC_{Kp} (Schwaber et al. 2014). Δυστυχώς, η συνεχιζόμενη αστάθεια στη Μέση Ανατολή θέτει σε κίνδυνο την πρόοδο αυτή, όπως δείχνουν αναφορές απομόνωσης KPC_{Kp} από πληγωμένους Σύριους στρατιώτες που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομεία του Ισραήλ (Lerner et al. 2016). Στην Κίνα, η συνηθέστερη καρβαπενεμάση είναι η KPC-2 (Chen et al. 2011), με κυρίαρχο τον κλώνο ST11 (Qi et al. 2011). Ανησυχητική είναι η εύρεση στελεχών *C. freundii* και *E. cloacae* με *bla*_{KPC} σε νοσοκομειακά αποχευτευτικά λύματα (Zhang et al. 2012), ενώ υπάρχουν αναφορές λοιμώξεων στην κοινότητα από στελέχη που έφεραν *bla*_{KPC} (Ge et al. 2011).



Εικόνα 2.2. (Albiger et al. 2015). Γεωγραφική κατανομή ΚΡCΚρ στην Ευρώπη.

Με σκούρο κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι χώρες σε ενδημική κατάσταση.

B) MBLs.

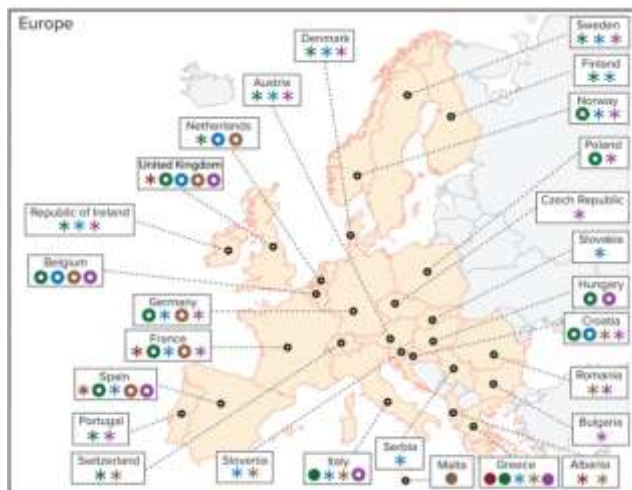
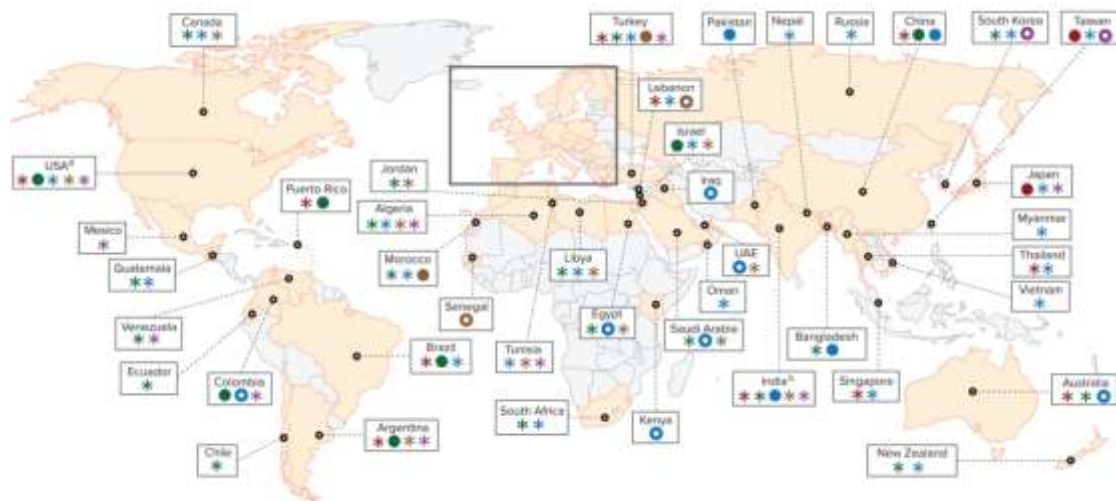
Το σημαντικότερο φορτίο καρβαπενεμασών της τάξης αυτής φαίνεται να βαραίνει την Ασία και με σημαντικότερη πηγή ανησυχίας τον τύπο NDM (van duin & Doi 2017). Μετά την πρώτη αναφορά το 2009 στη Σουηδία σε ασθενή που είχε νοσηλευτεί στην Ινδία (Yong et al. 2009), βρέθηκε πως έχει ευρεία εξάπλωση στην Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές (Kumarasamy et al. 2010, Kazi et al. 2015), και μάλιστα σχετίζεται και με λοιμώξεις της κοινότητας (Borah et al. 2016), ενώ μεγάλη ανησυχία έχει προκαλέσει η ανίχνευσή του σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού από το Νέο Δελχί (Walsh et al. 2011). Στην Ευρώπη ο τύπος NDM έχει σημαντική παρουσία στη Ρουμανία, Πολωνία και Δανία (van duin & Doi 2017), τη Σερβία και το Μαυροβούνιο (Grundmann et al. 2016) και την Ελλάδα, όπου σε πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη βρέθηκε να είναι ο δεύτερος συχνότερος τύπος καρβαπενεμάσης σε στελέχη *K.pneumoniae* μετά τον τύπο KPC (Galani et al. 2018).

Οι καρβαπενεμάσες τύπου IMP ενδημούν στην Ιαπωνία και την Ταιβάν (Nordmann et al. 2011b) και οι τύπου VIM στη Νότια Ευρώπη (Logan et al. 2017, Munoz-Price 2013). Υπάρχουν επίσης αναφορές των τύπων αυτών από την Τυνησία (Chouchani et al. 2013) και τη Νότια Αφρική (Peirano et al. 2012).

Γ) OXA-48.

Είναι ενδημικές στην Τουρκία και τη Μάλτα και με σημαντική εξάπλωση σε Ισπανία, Ρουμανία και Γαλλία (Albiger 2015). Έχουν επίσης βρεθεί στη Μέση Ανατολή, Αφρική, Ασία και Νότια Αμερική (van duin & Doi 2017).

Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανομή των καρβαπενεμασών που ανευρίσκονται σε εντεροβακτηριοειδή.



	IMP	KPC	NDM	OXA	VIM
Ευδημική κατάσταση	●	●	●	●	●
Σημαντική εξάπλωση	○	○	○	○	○
Σποραδικές αναφορές	*	*	*	*	*

Εικόνα 2.3. Παγκόσμια κατανομή των καρβαπενεμασών σε εντεροβακτηριοειδή (Logan et al. 2017).

Για την Ευρώπη, το 2015, το Ευρωπαϊκό Κέντρο Για την Πρόληψη και τον έλεγχο των Λοιμώξεων (ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control) δημοσίευσε τα αποτελέσματα έρευνας βασισμένης στις εκτιμήσεις ειδικών από 38 ευρωπαϊκές χώρες σε σχέση με την ανίχνευση και εξάπλωση στελεχών εντεροβακτηριακών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες (CPE - Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*) στις χώρες τους (Albiger et al. 2015). Για την περιγραφή της επιδημιολογικής κατάστασης κάθε χώρας χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα 5 επιδημιολογικών σταδίων, με διαβάθμιση από την ανυπαρξία τέτοιων στελεχών σε μια χώρα μέχρι την ενδημική κατάσταση. Παρόμοια εκτίμηση είχε προηγηθεί το 2013. Από τη σύγκριση των επιδημιολογικών σταδίων προέκυψαν τα στοιχεία που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Country	Epidemiological stage for the spread of CPE by type of carbapenemase									
	KPC		OXA48		VIM		NDM		IMP	
	2013 ^a	2014-2015 ^b	2013 ^a	2014-2015 ^b	2013 ^a	2014-2015 ^b	2013 ^a	2014-2015 ^b	2013 ^a	2014-2015 ^b
Albania	1	1	2a	0	1	0	0	0	2a	0
Austria	1	2b	1	1	2b	2a	2a	1	0	0
Belgium	3	4	3	4	3	3	1	3	0	0
Bosnia and Herzegovina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bulgaria	NA	2a	NA	1	2a	1	NA	2a	NA	0
Croatia	3	2a	1	3	1	2b	1	2a	1	1
Cyprus	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	1	0
Czech Republic	2b	2b	0	1	2a	2b	1	1	0	0
Denmark	1	1	1	1	2a ^c	0	1	4	0	0
Estonia	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	0
Finland	2a	2a	1	1	1	1	1	1	0	1
France	2b	2b	3	4	2b	2b	2a	3	2a	1
Germany	3	2b	2b	3	2b	1	2a	2b	1	1
Greece	5	5	1	1	5	5	0	3	0	0
Hungary	3	1	1	2b	4	4	0	1	0	0
Iceland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ireland	4	3	3	3	2a	1	1	2a	1	1
Israel	4	4	2b	2b	0	1	2a	2b	0	0
Italy	5	5	2b	3	4	4	2b	1	0	0
Kosovo*	2b	0	2b	0	0	0	1	0	0	0
Latvia	1	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
Lithuania	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
Luxembourg	1	1	0	1	1	1	0	0	NA	1
Malta	0 ^c	0	5	5	0 ^c	1	0 ^c	0	1	1
Montenegro	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0
The Netherlands	2a	2a	2b	2a	1	2a	1	1	1	1
Norway	2a	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Poland	3	3	1	1	1	2b	1	4	0	DNK
Portugal	1	2b	0	1	1	1	0	2a	0	0
Romania	NA	4	1	4	NA	2a	1	4	NA	NA
Serbia	NA	1	NA	2b	NA	0	NA	2b	NA	0
Slovakia	NA	4	NA	0	NA	1	2a	1	NA	0
Slovenia	1	1	1	2a	1	1	1	2a	0	0
Spain	2b	3	3	4	3	4	1	2b	2b	1
Sweden	2a	1	1	2a	1	1	2a	1	0	1
The former Yugoslav Republic of Macedonia	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	NA
Turkey	2b	0	1	5	1	2b	1	3	1	1
United Kingdom	3	4 ^d	3	2b	3	2b	2b	2b	1	0

Πίνακας 2.1. Σύγκριση επιδημιολογικών σταδίων εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες σε 38 ευρωπαϊκές χώρες, 2013-2015 (Albiger et al. 2015).

Γκριζο χρώμα : δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία.

Σκούρο πράσινο (Στάδιο 0): καμία αναφορά

Ανοικτό πράσινο (Στάδιο 1): σποραδική εκδήλωση

Κίτρινο (Στάδιο 2a): μοναδική νοσοκομειακή εκδήλωση

Πορτοκαλί (Στάδιο 2b): σποραδικές νοσοκομειακές εκδηλώσεις

Σκούρο Πορτοκαλί (Στάδιο 3): τοπική εξάπλωση

Κόκκινο (Στάδιο 4) : πολλαπλές τοπικές εκδηλώσεις

Καφέ (Στάδιο 5): ενδημική κατάσταση: τα περισσότερα νοσοκομεία της χώρας αντιμετωπίζουν επανειλημμένα κρούσματα

NA: μη διαθέσιμα στοιχεία

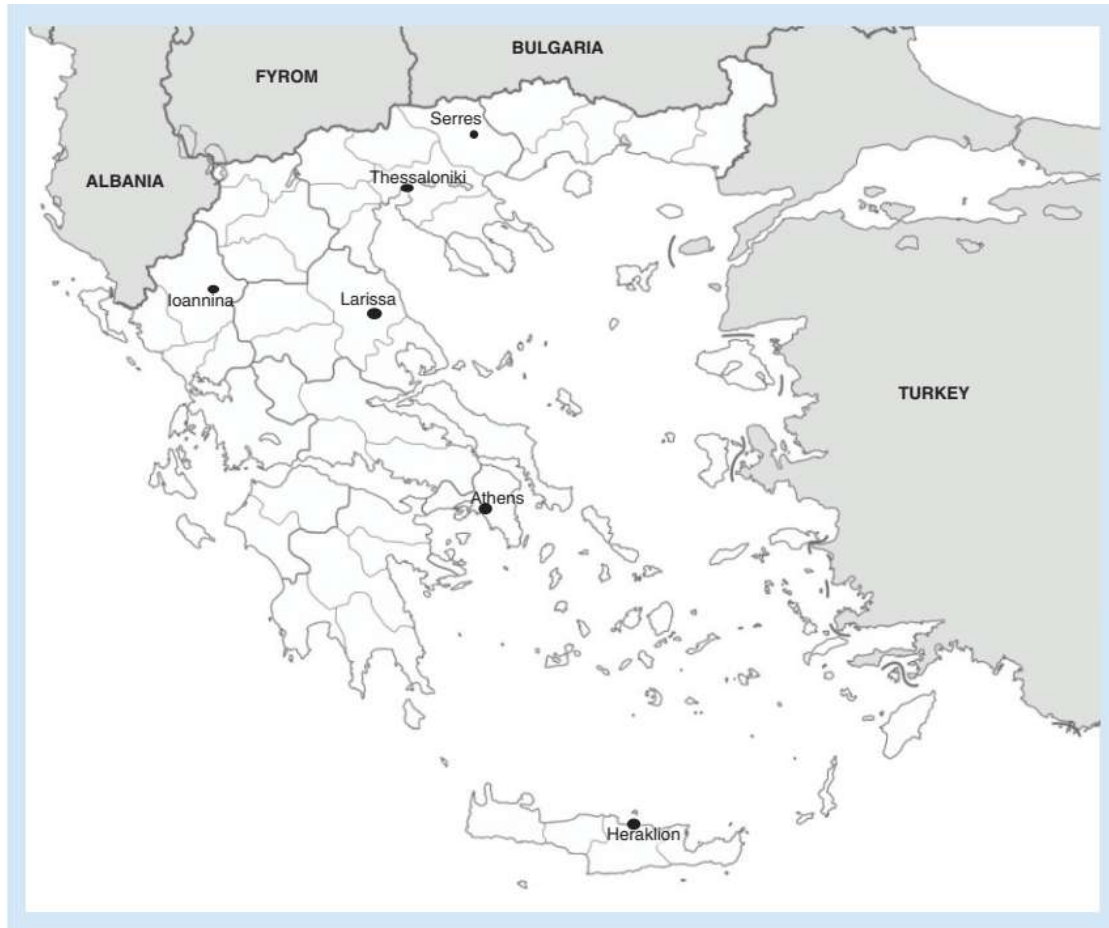
^a Αποτελέσματα που βασίστηκαν σε ερωτηματολόγια αυτοαξιολόγησης σε ειδικούς από κάθε χώρα που συμμετείχε στο πρόγραμμα EuSCAPE (European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*) (Φεβρουάριος 2013)

^b Αποτελέσματα που βασίστηκαν σε ερωτηματολόγια στους ειδικούς Μάρτιο-Μάιο 2015

Από τη σύγκριση των στοιχείων φάνηκε πως η επιδημιολογική κατάσταση των CPE στις συμμετέχουσες χώρες επιδεινώθηκε, κυρίως λόγω της εξάπλωσης των στελεχών που παράγαν καρβαπενεμάσες τύπου OXA-48 και NDM. Έτσι, οι χώρες σε ενδημική κατάσταση ή με πολλαπλές τοπικές εκδηλώσεις αυξήθηκαν από 6 ανάμεσα στις 38 που συμμετείχαν στην καταγραφή, σε 13, μέσα σε διάστημα δύο ετών. Η επιδεινούμενη απειλή οδήγησε τις περισσότερες από τις ευρωπαϊκές χώρες σε καθιέρωση κανόνων ελέγχου και επιτήρησης λοιμώξεων (Albiger et al. 2015).

2.2. Η ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η Ελλάδα βιώνει μερικά από τα χειρότερα επίπεδα αντοχής των εντεροβακτηριακών στις καρβαπενέμες που έχουν παρατηρηθεί διεθνώς. Όπως αναφέρθηκε, το αναφερόμενο για τη χώρα μας ποσοστό διεισδυτικών στελεχών *K. pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες από το ECDC για το 2017 υπερέβαινε το 50% (Εικόνα 2.1). Πριν το 2001, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων αναφέρει επιπολασμό αντοχής <1%. Η πρώτη περιγραφή καρβαμενεμάσης, η οποία ήταν τύπου MBL (VIM-1) σε κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* έγινε το 2002, από μελέτη σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας 3 πανεπιστημιακών νοσοκομείων στην Αθήνα που ανίχνευσε 17 στελέχη που έφεραν το *bla_{VIM-1}* γονίδιο (Giakkoupi et al. 2003, Εικόνα 2.4). Έκτοτε, αρκετοί άλλοι τύποι VIM έχουν ανιχνευθεί στην Ελλάδα (Karampatakis et al. 2016). Ο τύπος VIM-1 ήταν ο κυρίαρχος τύπος καρβαπενεμάσης στην Ελλάδα έως το 2008 οπότε έγινε η πρώτη περιγραφή καρβαπενεμάσης τύπου KPC (KPC-2) (Tsakris et al. 2008, Εικόνα 2.4) και συνακόλουθη γρήγορη εξάπλωσή της. Το 2009, ένα τεταρτοβάθμιο νοσοκομείο στην Κρήτη ανακοίνωσε εκδήλωση κρουσμάτων KPCκρ που έφεραν KPC-2 (Maltezou et al. 2009). Εντός 2 ετών, τέτοια στελέχη είχαν εξαπλωθεί στα περισσότερα μεγάλα νοσοκομεία της χώρας (Pournaras et al. 2009, Giakkoupi et al. 2009, Souli et al. 2010, Kontoroulou et al. 2010). Η πλειοψηφία των στελεχών φάνηκε από την αρχή της επιδημίας να ανήκει στον κλώνο ST258 (Giakkoupi et al. 2009), ο οποίος συνέχισε να κυριαρχεί, ενώ αργότερα εντοπίστηκαν και άλλοι κλώνοι (Giakkoupi et al. 2013).



Εικόνα 2.4. Γεωγραφική απεικόνιση πόλεων όπου ανιχνεύθηκαν γονίδια καρβαπενεμασών σε στελέχη *K. pneumoniae* για πρώτη φορά στην Ελλάδα (Karampatakis et al. 2016). Οι τύποι VIM-1, VIM-4 και VIM-39 απομονώθηκαν για πρώτη φορά στην Αθήνα τα έτη 2002, 2009 και 2008 αντίστοιχα. Οι VIM-26 και VIM-27 ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στη Λάρισα το 2008 και 2010 αντίστοιχα, ο VIM-12 στη Θεσσαλονίκη το 2005 και ο VIM-19 το 2008 στις Σέρρες. Ο τύπος KPC-2 περιγράφηκε για πρώτη φορά το έτος 2008 σε ασθενή από τις Σέρρες ενώ την ίδια χρονιά σημειώθηκε έξαρση κρουσμάτων σε γενικό νοσοκομείο του Ηρακλείου Κρήτης. Ο τύπος NDM-1 πρωτοπεριγράφηκε το 2011 στα Ιωάννινα και ο τύπος OXA-48 το 2012 στην Αθήνα.

Το 2011 έγινε η πρώτη καταγραφή καρβαπενεμάσης τύπου NDM στη χώρα, από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (Voulgari et al. 2014, Εικόνα 2.4). Έκτοτε έχουν καταγραφεί σποραδικά κρούσματα σε νοσοκομεία των Αθηνών, της Πάτρας και της Λάρισας (Giakkoupi et al. 2013, Spyropoulou et al. 2016, Papagiannitsis et

al. 2017). Όλα βρέθηκαν να ανήκουν στον τύπο ST 11. Η πρώτη καταγραφή καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48 έγινε το 2012 στην Αθήνα (Voulgari et al. 2013, Εικόνα 2.4). Με την εξαίρεση σποραδικών περιπτώσεων, δεν έχουν σημειωθεί επιδημικές εξάρσεις εξαιτίας στελεχών *K. pneumoniae* OXA-48.

Το 2018 δημοσιεύθηκε πανελλήνια πολυκεντρική μελέτη με σκοπό την επιδημιολογική μελέτη των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες στην Ελλάδα, η οποία μελέτησε 394 κλινικά στελέχη από 15 ελληνικά νοσοκομεία της επικράτειας, στη διάρκεια των ετών 2014-2016 (Galani et al. 2018). Σύμφωνα με αυτήν, ο τύπος KPC βρέθηκε να είναι ο επικρατών τύπος καρβαπενεμάσης (66.5%), ακολουθούμενος από τον τύπο NDM (13.7%) (Πίνακας 2.2). Οι τύποι VIM και OXA-48 ακολούθησαν στην τρίτη και τέταρτη θέση (ποσοστά 8.6% και 3.6%). Σε προηγούμενη παρόμοια μελέτη που διεξήχθη σε 119 ελληνικά νοσοκομεία από τον Ιανουάριο 2011 έως τον Ιούνιο 2012, στην πρώτη θέση βρισκόταν και πάλι ο τύπος KPC (82.6%), ενώ στη δεύτερη θέση βρισκόταν ο τύπος VIM (9.7%) (Maltezou et al. 2014). Φαίνεται λοιπόν πως ο τύπος NDM πήρε τη θέση των VIM στη σειρά συχνότητας εμφάνισης καρβαπενεμασών στην Ελλάδα. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Galani et al. συμφωνούν με τα στοιχεία από το πρόγραμμα Euscaper (European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae) του ECDC, που έλαβε χώρα μεταξύ Νοεμβρίου 2013 και Απριλίου 2014 και ανέφερε για πρώτη φορά πως η NDM είναι η δεύτερη κατά σειράν συχνότητας τάξη καρβαπενεμάσης στην Ελλάδα (Grundmann et al. 2016) (Πίνακας 2.3).

Στους πίνακες 2.2 και 2.3 εμφανίζονται στοιχεία από τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών.

Participating hospitals	Carbapenem-non-susceptible <i>K. pneumoniae</i> isolates submitted	Confirmed carbapenemase-producing <i>K. pneumoniae</i> isolates										Other mechanism of carbapenem resistance	
		KPC		NDM		VIM		OXA-48-like		KPC + VIM or other dual combination		n	%
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Athens metropolitan area	167	103	61.7	25	15.0	20	12.0	12	7.2	7	4.2	0	0.0
University General Hospital Attikon ^a	32	15	46.9	10	31.2	1	3.1	4	12.5	2	6.2	0	0.0
General Hospital of Athens 'G. Gennimatas'	25	19	76.0	2	8.0	0	0.0	4	16.0	0	0.0	0	0.0
KAT Hospital	48	34	70.8	2	4.2	8	16.7	1	2.1	3 ^b	6.2	0	0.0
Hippokration Athens General Hospital	20	13	65.0	4	20.0	2	10.0	0	0.0	1 ^c	5.0	0	0.0
Athens Naval Hospital	18	12	66.7	3	16.7	0	0.0	3	16.7	0	0.0	0	0.0
Thriassio General Hospital	7	2	28.6	0	0.0	5	71.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Hygeia General Hospital	14	6	42.8	3	21.4	4	28.6	0	0.0	1 ^c	7.1	0	0.0
St Savvas Cancer Hospital	3	2	66.7	0	0.0	1	33.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Thessaloniki	90	60	66.7	7	7.8	5	5.6	2	2.2	13	14.4	3	33.3
Cancer Hospital of Thessaloniki 'THEAGENEIO'	43	30	69.8	1	2.3	4	9.3	0	0.0	5	11.6	3	7.0
'G. Papanikolaou' General Hospital of Thessaloniki	27	17	63.0	1	3.7	1	3.7	0	0.0	8	29.6	0	0.0
General Hospital of Thessaloniki 'G. Gennimatas'	20	13	65.0	5	25.0	0	0.0	2	10.0	0	0.0	0	0.0
Crete	77												
University Hospital of Heraklion	77	65	84.4	5	6.5	6	7.8	0	0.0	1	1.3	0	0.0
Central Greece	39	31	79.5	1	2.6	2	5.1	0	0.0	4	10.3	1	2.6
University Hospital of Larissa	20	18	90.0	0	0.0	2	10.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
General Hospital of Lamia	19	13	68.4	1	5.3	0	0.0	0	0.0	4	21.1	1	5.3
Western Greece	21												
General Hospital of Corfu	21	3	14.3	17	81.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	4.8
Total	394	262	66.5	54	13.7	34	8.6	14	3.6	25	6.3	5	1.3

Πίνακας 2.2. Πανελλήνια Πολυκεντρική Μελέτη Galani et al. 2018. Ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* προερχόμενα από τα συμμετέχοντα νοσοκομεία, αριθμός, ποσοστό στελεχών και τύπος παραγομένης καρβαπενεμάσης.

	Hospitals submitting carbapenem non-susceptible <i>K pneumoniae</i> isolates (n)	Number of submitted carbapenem non-susceptible <i>K pneumoniae</i> isolates	Confirmed carbapenemase-producing <i>K pneumoniae</i> isolates					Other (n, %)*
			KPC (n, %)	NDM (n, %)	OXA-48-like (n, %)	VIM (n, %)	Total (n, %)	
Albania	3	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)
Austria	6	15	6 (40-0)	2 (13-3)	2 (13-3)	0 (0)	10 (66-7)	5 (33-3)
Belgium	11	48	13 (27-1)	2 (4-2)	18 (37-5)	0 (0)	33 (68-8)	15 (31-3)
Bulgaria	3	4	0 (0)	2 (50-0)	0 (0)	0 (0)	2 (50-0)	2 (50-0)
Croatia	14	48	1 (2-1)	0 (0)	1 (2-1)	5 (10-4)	7 (14-6)	41 (85-4)
Cyprus	1	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Czech Republic	5	26	0 (0)	1 (3-8)	1 (3-8)	0 (0)	2 (7-7)	24 (92-3)
Denmark	3	8	1 (12-5)	3 (37-5)	2 (25-0)	0 (0)	6 (75-0)	2 (25-0)
Estonia	1	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (100)
Finland	1	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
France	11	27	1 (3-7)	0 (0)	10 (37-0)	0 (0)	11 (40-7)	16 (59-3)
Germany	13	36	8 (22-2)	2 (5-6)	12 (33-3)	0 (0)	22 (61-1)	14 (38-9)
Greece	10	86	56 (65-1)	12 (14-0)	2 (2-3)	9 (10-5)	79 (91-9)	7 (8-1)
Hungary	7	36	0 (0)	0 (0)	0 (0)	26 (72-2)	26 (72-2)	10 (27-8)
Ireland	7	12	2 (16-7)	2 (16-7)	2 (16-7)	0 (0)	6 (50-0)	6 (50-0)
Israel	7	39	31 (79-5)	2 (5-1)	1 (2-6)	0 (0)	34 (87-2)	5 (12-8)
Italy	22	195	187 (95-9)	1 (0-5)	1 (0-5)	3 (1-5)	192 (98-5)	3 (1-5)
Latvia	1	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50-0)	2 (50-0)	2 (50-0)
Lithuania	4	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Luxembourg	3	10	4 (40-0)	0 (0)	2 (20-0)	2 (20-0)	8 (80-0)	2 (20-0)
Malta	1	9	0 (0)	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
Montenegro	1	10	0 (0)	10 (100)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)
Norway	4	5	0 (0)	1 (20-0)	0 (0)	0 (0)	1 (20-0)	4 (80-0)
Poland	10	34	2 (5-9)	2 (5-9)	0 (0)	0 (0)	4 (11-8)	30 (88-2)
Portugal	17	61	36 (59-0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	36 (59-0)	25 (40-9)
Romania	8	68	4 (5-9)	5 (7-4)	50 (73-5)	2 (2-9)	61 (89-7)	7 (10-3)
Serbia	11	67	1 (5)	33 (49-3)	9 (13-4)	0 (0)	43 (64-2)	24 (35-8)
Slovakia	5	22	1 (4-5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4-5)	21 (95-5)
Slovenia	4	12	0 (0)	1 (8-3)	1 (8-3)	1 (8-3)	3 (25-0)	9 (75-0)
Spain	20	116	9 (7-8)	0 (0)	81 (69-8)	12 (10-3)	102 (87-9)	14 (12-1)
Macedonia	1	3	2 (66-7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (66-7)	1 (33-3)
Turkey	17	124	0 (0)	9 (7-3)	98 (79-0)	5 (4-0)	112 (90-3)	12 (9-7)
UK-England and Northern Ireland	15	47	14 (29-8)	3 (6-4)	7 (14-9)	1 (2-1)	25 (53-2)	22 (46-8)
UK-Scotland	4	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)
Total	251	1203	379 (31-5)	93 (7-7)	310 (25-8)	68 (5-7)	850 (70-7)	353 (29-3)

Iceland, Kosovo, and Sweden did not find any *K pneumoniae* isolates that were suspected non-susceptible to carbapenems during the study period. *Other mechanism of carbapenem non-susceptibility, since none of the genes coding for the four major types of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48-like and VIM) were detected. All data are n, except where otherwise indicated.

Table 2: *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates submitted as non-susceptible to carbapenems, confirmed as producing a carbapenemase and type of carbapenemase, by country

Πίνακας 2.3. EuSCAPE, ECDC (Grundmann et al. 2016). Στελέχη *K. pneumoniae* που υποβλήθηκαν ως μη ευαίσθητα στις καρβαπενέμες και με επιβεβαιωμένη την παραγωγή συγκεκριμένης τάξης καρβαπενεμάσης, ανά χώρα.

Κεφάλαιο 3. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *K. pneumoniae* ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ - ΑΙΤΙΑ ΤΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΔΥΣΚΟΛΙΩΝ

3.1. ΠΟΛΥΑΝΤΟΧΗ

Τα μικρόβια αυτά είναι ανθεκτικά στα περισσότερα αντιβιοτικά, αφήνοντας ελάχιστες θεραπευτικές επιλογές. Τα γονίδια των καρβαπενεμασών συνήθως εντοπίζονται σε κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια, τα οποία κατά κανόνα συνοδεύονται από γονίδια που κωδικοποιούν αντοχή και σε άλλες β-λακτάμες ή σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών, ευρισκόμενα συχνά, αλλά όχι απαραίτητα, στο ίδιο κινητό στοιχείο (Schultz et al. 2012). Επιπλέον, τα κινητά αυτά στοιχεία μπορεί να φέρουν ιντεγκρόνια, γενετικά στοιχεία ειδικά εξοπλισμένα να προσλαμβάνουν και να ενσωματώνουν άλλα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν φαρμακευτική αντοχή (Cambrey 2010). Έτσι, πλασμίδια με το γονίδιο *bla_{KPC}* βρέθηκαν ταυτόχρονα να φέρουν γονίδια αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, ενώ σχετίστηκαν και με άλλα γονίδια β-λακταμασών, όπως το πιο διαδεδομένο ESBL γονίδιο *bla_{CTX-M-15}* (Nordmann et al. 2009). Σε ένα στέλεχος *K.pneumoniae*, 7 διαφορετικές β-λακταμάσες βρέθηκαν να συνδέονται με το *bla_{KPC}* (Moland et al. 2007). Γονίδιο *bla_{KPC-3}* από στελέχη CRKp που ανιχνεύθηκαν στις ΗΠΑ και το Ισραήλ βρέθηκε να σχετίζεται με τα γονίδια αντοχής στις κινολόνες QnrQ και QnrB (Endimiani et al. 2008).

Η αντοχή στις β-λακτάμες δεν οφείλεται μόνον στη συνύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν άλλες λακταμάσες. Έτσι, η καρβαπενεμάση KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), παρότι έχει μέτρια υδρολυτική ικανότητα έναντι των καρβαπενεμών, παρουσιάζει τεράστια ικανότητα σύνδεσης με πολλαπλά υποστρώματα (πχ πενέμες, κεφέμες, κεφαλοσπορίνες, περιλαμβανομένων κεφαμυκινών και εξελιγμένης γενεάς κεφαλοσπορινών), όπως επίσης και ικανότητα υδρόλυσης των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων των β-λακταμασών (κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη) (Perez et al. 2016). Η ευαισθησία στις β-λακτάμες εξαρτάται από τον τύπο της καρβαπενεμάσης. Τα στελέχη που φέρουν KPC είναι συνήθως ανθεκτικά σε όλες τις β-λακτάμες, με εξαίρεση την τεμοσιλλίνη που μπορεί να διατηρεί κάποια δραστηριότητα (Adams-Haduch et al. 2009). Τα στελέχη που

παράγουν NDM, VIM και IMP μπορεί να παραμένουν ευαίσθητα στην αζτρεονάμη, αν και στην πλειοψηφία τους είναι ανθεκτικά λόγω της συνυπάρξεως ESBLs ή άλλων κεφαλοσπορινασών που την υδρολύουν (Perez et al.2016). Τέλος, περίπου 20% αυτών που παράγουν OXA-48 μπορεί να είναι ευαίσθητα στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (Nordmann et al. 2012).

Η ευαισθησία στις φλουοροκινολόνες είναι σπάνια μεταξύ των CPKp, ενώ στη σουλφαμεθοξαζόλη και τις αμινογλυκοσίδες απρόβλεπτη. Μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τον κλώνο μιας επιδημίας. Επιπλέον, υπάρχει αυξημένη επίπτωση των 16S rRNA μεθυλασών, που παρέχουν αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες, κυρίως στα CPKp που παράγουν NDM (Sidjabat et al.2011).

3.2. ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ

Ως συνέπεια της πολυαντοχής των CPKp, ελάχιστα αντιβιοτικά μπορεί να παραμένουν ενεργά και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας επισημαίνει την επιτακτική ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών (WHO). Μεταξύ των τελευταίων θεραπευτικών επιλογών είναι η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη, η γενταμικίνη και η φωσφομυκίνη (Giamarellou et al. 2009, Livermore et al. 2010, Carmeli et al. 2010, Tzouveleakis et al. 2012, Karaiskos et al. 2014, Daikos et al. 2014). Δυστυχώς, η δραστηρότητά τους μπορεί να περιοριστεί λόγω των φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων, της τοξικότητας αλλά και αυξανόμενης αντοχής σε αυτά. Ως απάντηση στην πίεση για εξεύρεση νέων αντιβιοτικών, πρόσφατα τέθηκαν στη διάθεση της ιατρικής κοινότητας δύο νέοι πολλά υποσχόμενοι φαρμακευτικοί παράγοντες. Πρόκειται για τους συνδυασμούς δύο ήδη χρησιμοποιούμενων β-λακταμικών αντιβιοτικών με δύο νέους αναστολείς β-λακταμασών, της κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης και της μεροπενέμης/βαμπορμπακτάμης. Οι πρώτες εμπειρίες είναι ενθαρρυντικές, ωστόσο ακόμη δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις υπέρ της χρήσης τους, έχουν ήδη καταγραφεί πρώιμες περιπτώσεις αντοχής, ενώ δεν είναι δραστηροί για τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου MBL (ίδε κεφάλαιο: «Νέες θεραπείες»).

Η κολιστίνη, παλαιό αντιβιοτικό που εγκαταλείφθηκε πριν από δεκαετίες λόγω της νεφρο- και νευροτοξικότητός του και που «ανακαλύφθηκε» εκ νέου τη δεκαετία

του 1990 κυρίως για να καλύψει την ανάγκη αντιμετώπισης πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* και *P. aeruginosa*, παρουσιάζει προβλήματα στη χρήση της. Αφ'ενός, η κατάλληλη δοσολογία έτσι ώστε να επιτευχθεί ταχύτερα η συγκέντρωση εκείνη που συσχετίζεται με καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, χωρίς ταυτόχρονα να προκληθούν τοξικά φαινόμενα, παραμένει αντικείμενο έρευνας. Αφ'ετέρου, υπάρχουν ζητήματα σχετικά με τη φαρμακοκινητική της στους βαρέως πάσχοντες, την ποικιλοότητα των διαθέσιμων μορφών λήψης, καθώς και σοβαρά εργαστηριακά ζητήματα που αφορούν τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των στελεχών σε αυτήν, κάτι που πρόσφατα οδήγησε στην ανάγκη για έκδοση σχετικών οδηγιών από τους διεθνείς οργανισμούς CLSI και EUCAST (EUCAST 2017). Ταυτόχρονα, όλο και συχνότερα ανακοινώνονται διεθνώς επιδημικές εξάρσεις CPKp ανθεκτικών στην κολιστίνη (Mammìna et al. 2011, Bogdanovich et al. 2011, Marchaim et al. 2011, Kontopoulou et al. 2010). Στην Ιταλία, μια από τις πιο επιβαρυνμένες από τα CPKp χώρες, η αντοχή στην κολιστίνη τριπλασιάστηκε εντός 5 ετών (2010-2014) ενώ η θνητότητα 30 ημερών ασθενών με βακτηριαιμία από στελέχη KPC-Kp ανθεκτικών στην κολιστίνη έφτασε το 51% (Giacobbe et al. 2015). Στη χώρα μας, πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη βρήκε αντοχή των CPKp στην κολιστίνη της τάξεως του 40.4% (Galani et al. 2018), ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από το 28.3% που εντόπισε σε ευρωπαϊκό επίπεδο η μελέτη Euscaper (Grundmann et al. 2016).

Η τιγκεκυκλίνη έχει δράση κατά βάση βακτηριοστατική, και οι φαρμακοκινητικές /φαρμακοδυναμικές ιδιότητές της δεν επιτρέπουν την επίτευξη δραστικών επιπέδων σε πολλές ανατομικές περιοχές (Tzouveleakis et al. 2012, Perez et al. 2016). Επιπλέον, έχουν δημοσιευθεί αναφορές υψηλότερου κινδύνου θανάτου για ασθενείς που έλαβαν τιγκεκυκλίνη σε σχέση με άλλα αντιβιοτικά (Cai et al. 2011, Yahav et al. 2011, Prasad et al. 2012), ενώ το FDA έχει εκδόσει δύο προειδοποιήσεις σχετικά με τον κίνδυνο χρήσης της, κυρίως για τη θεραπεία της πνευμονίας από αναπνευστήρα (FDA 2010, FDA 2013). Και για την τιγκεκυκλίνη έχουν παρατηρηθεί σημαντικά ποσοστά αντοχής, καθώς και συσχέτιση της αντοχής με αυξημένη χρήση του φαρμάκου, συνακόλουθη της αυξημένης επίπτωσης των CPKp (Papadimitriou-Olivgeris et al. 2018, van Duin et al. 2015, Meletis et al. 2015). Στην προαναφερθείσα μελέτη των Galani et al, βρέθηκε αντοχή των CPKp στην τιγκεκυκλίνη 48.5%.

Η φωσφομυκίνη είναι αντιβιοτικό του οποίου κύρια ένδειξη αποτελεί η θεραπεία των λοιμώξεων του ουροποιητικού, ενώ προκαλεί ταχεία ανάπτυξη αντοχής

(Tzouveleakis et al.2012). Τέλος οι αμινογλυκοσίδες χαρακτηρίζονται από στενό θεραπευτικό «παράθυρο» και είναι δύσκολη η επίτευξη δραστηκότητας σε αυξημένη MIC του μικροοργανισμού, όπως συχνά συμβαίνει στα CPKp, καθώς και από τοξικές δράσεις.

3.3. ΘΑΝΑΣΙΜΗ ΑΠΕΙΛΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΙΟ ΕΥΑΛΩΤΟΥΣ

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες κυρίως αφορούν ευάλωτους ασθενείς με σοβαρές, χρόνιες ή οξείες νόσους, καθώς και επιβαρυσμένους με πολλαπλές συννοσηρότητες (Perez et al. 2013, Tzouveleakis et al.2012). Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει παράγοντες που προδιαθέτουν σε λοίμωξη από τέτοια στελέχη, και όλοι σχετίζονται με σοβαρή κατάσταση ή επιβαρυσμένη υγεία: κακή γενική κατάσταση, νοσηλεία σε ΜΕΘ, λήψη αντιβιοτικών και μάλιστα κινολονών ή αντιψευδομοναδικών πενικιλινών, παρουσία κεντρικού φλεβικού καθετήρα ή/και ουροκαθετήρα, σακχαρώδης διαβήτης, προηγούμενη επεμβατική διαδικασία, κακοήθεια, τραχειοστομία (Schwaber et al. 2008, Borer et al. 2012, Schechner et al. 2013). Το 2014 οι Gianella et al πρότειναν ένα σύστημα βαθμονόμησης για να προσδιορίσουν τον κίνδυνο μικροβιαμίας μεταξύ των φορέων τέτοιων στελεχών, σύμφωνα με το οποίο οι παράγοντες που καθορίζουν το ρίσκο είναι η νοσηλεία σε ΜΕΘ, επεμβάσεις στην κοιλιακή χώρα, χημειο/ακτινοθεραπεία και αποικισμός του ασθενούς με το επικίνδυνο παθογόνο σε περιοχές άλλες πλην του ορθού (Giannella et al. 2014), οι οποίοι επίσης και αυτοί δείχνουν τη σοβαρή κατάσταση των ασθενών. Μάλιστα, το λεγόμενο Gianella risk score επικυρώθηκε από επακόλουθους ερευνητές (Cano et al. 2018). Με δεδομένη τη σοβαρή τους κατάσταση, οι ασθενείς που εκδηλώνουν λοίμωξη από CPKp, θα πρέπει να τυγχάνουν επιθετικής και αποτελεσματικής αντιμετώπισης. Αντ' αυτού, οι κλινικοί είναι κατ' ουσίαν «αφοπλισμένοι», με ελάχιστες ή πολύ «αδύναμες» θεραπευτικές επιλογές στη διάθεσή τους. Δεν αποτελεί έκπληξη, λοιπόν, η υψηλή θνητότητα που έχει αναφερθεί από πολλαπλές πηγές για τέτοιες λοιμώξεις.

3.4. ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται στοιχεία από μελέτες της θνητότητας που προκαλεί η βακτηριαμία αλλά και άλλες λοιμώξεις από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες. Παρατηρούνται ποσοστά συνολικής θνητότητας από 38 έως 79%, ενώ της θνητότητας που αποδίδεται στην αντοχή στις καρβαπενέμες από 11 ως 50%. Πρόσφατη στατιστική μετα-ανάλυση των αναφερομένων και επιπλέον μελετών έδειξε ότι οι ασθενείς με λοιμώξεις που οφείλονται σε εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αντιμετωπίζουν περίπου 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να πεθάνουν από αυτούς με λοιμώξεις ευαίσθητες στις καρβαπενέμες (Martin et al. 2018). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τη σύγκριση λοιμώξεων από KPC/Kr και λοιμώξεων ευαίσθητων στις καρβαπενέμες, καθώς οι ασθενείς της πρώτης κατηγορίας βρέθηκαν να έχουν 2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από τους ασθενείς της δεύτερης. Η ίδια μετα-ανάλυση καταλήγει ότι μεταξύ των αιτιών για την αυξημένη θνητότητα των λοιμώξεων αυτών είναι η καθυστέρηση της ενάρξεως ενεργού αντιμικροβιακής θεραπείας, καθώς και η αβεβαιότητα σχετικά με την αποτελεσματικότερη θεραπεία. Σημειώνεται ότι μεταξύ των ευρημάτων της εντοπίζεται και αυξημένος κίνδυνος θνητότητας των ασθενών που λαμβάνουν μονοθεραπεία εν σχέσει με αυτούς που λαμβάνουν συνδυασμό ενεργών αντιβιοτικών (Martin et al. 2018).

Πίνακας 3.1. Μελέτες θνητότητας λοιμώξεων από στελέχη *K.pneumoniae* με διαφόρων μορφών ανοχή στις καρβαπενέμες

Μελέτη	Στελέχη	Είδος λοίμωξης	Είδος μελέτης	Ενδονοσοκομειακή Θνητότητα (%)	Θνητότητα αποδιδόμενη στη λοίμωξη (%)
Patel 2008	CRKp	διάφορες	A/M	48%	38%
Schwaber 2008	CRKp	διάφορες	A/M	44%	31.5%
Daikos 2009	VIMKp	βακτηριαμιά	Προοπτική παρατήρησης	42.9%	27%
Borer 2009	CRKp	βακτηριαμιά	Αναδρομική A/M	72%	50%
Mouloudi 2010	KPCKp	βακτηριαμιά	A/M	79%	37%
	MBLKp			56%	17%
Neuner 2011	CRKp	βακτηριαμιά	Αναδρομική παρατήρησης	58%	ΔΠ
Ben-David 2012	CRKp	βακτηριαμιά	Αναδρομική παρατήρησης	69%	48%
Zarkotou 2011	KPCKp	βακτηριαμιά	Προοπτική παρατήρησης	53%	34%
Hussein et al. 2013	CRKp	βακτηριαμιά	A/M	43.7%	14.7%
Papadimitriou-Olivgeris et al. 2013	KPCKp	διάφορες	A/M	38,4%	11%
Falagas 2014 _a	CRKp	διάφορες	Μεταανάλυση (συμπεριλ. 9 μελέτες)	ΔΠ	26%-44%
Fraenkel-Wandel 2015	KPCKp	βακτηριαμιά	A/M	65%	25%
Hauck 2015	CRKp	βακτηριαμιά	Προοπτική παρατήρησης	ΔΠ	27%
		πνευμονία			27%
		ουρολοίμωξη			-

CRKp: *K.pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες
 KPCKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC
 VIMKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου VIM
 MBLKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου MBL
 A/M: Ασθενών/Μαρτύρων (Case-control)
 ΔΠ: δεν προσδιορίστηκε

Κεφάλαιο 4. ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Η απειλή που συνιστούν τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες παθογόνα για τη δημόσια υγεία οδήγησε στην αντίδραση της διεθνούς κοινότητας. Στην Ευρώπη, η πρωτοβουλία Innovative Medicines Initiative - New Drugs for Bad Bugs (ND4BB) (IMI) παρείχε χρηματοδότηση για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και στις ΗΠΑ η κυβέρνηση σε συνεργασία με το FDA προχώρησε στην κίνηση GAIN (Generating Antibiotic Incentives Now), με στόχο την ανάπτυξη και έγκριση νέων αντιμικροβιακών. Το 2010, η Infectious Diseases of America (IDSA) ξεκίνησε την πρωτοβουλία «10x'20», με στόχο την ανάπτυξη 10 νέων αντιβιοτικών ως το 2020 (Boucher et al. 2013). Σημαντικό βήμα προόδου ήταν η έγκριση δύο νέων παραγόντων που αποτελούν συνδυασμό ήδη υπάρχουσών αντιβιοτικών της τάξεως των β-λακταμών, της κεφταζιδίμης και της μεροπενέμης, με νέους λακταμασικούς αναστολείς, την αβιμπακτάμη (Stachyra et al. 2009) και τη βαμπορμπακτάμη (Lomovskaya et al. 2017), αντίστοιχα.

A) *Κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη*: Η αβιμπακτάμη αποτελεί δραστικό αναστολέα καρβαπενεμασών που φέρουν σερίνη, και συγκεκριμένα των τάξης A και πολλών τάξης D. Σε μελέτες, η κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη βρέθηκε δραστική έναντι στελεχών *K.pneumoniae* που παρήγαγαν KPC καρβαπενεμάσες (Li et al. 2015) και των περισσότερων που παρήγαγαν OXA-48 (Vasoo et al. 2015). Σε μεγάλη μελέτη στα πλαίσια του προγράμματος International Network For Optimal Resistance Monitoring (INFORM), όπου συμμετείχαν 18 Ευρωπαϊκές χώρες, διαπιστώθηκε ευαισθησία σε αυτήν του 98.5% των μη ευαισθητών στη μεροπενέμη στελεχών εντεροβακτηριοειδών (MBL αρνητικών) που εξετάστηκαν (Kazmierczak et al. 2018). Έχει λάβει έγκριση από τους οργανισμούς FDA (US Food and Drug Administration) και EMA (European Medicines Agency) για χρήση σε επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις και ενδοκοιλιακές λοιμώξεις καθώς και νοσοκομειακής πνευμονίας, ενώ ο τελευταίος (EMA) πρόσφατα προσέθεσε στις ενδείξεις και τη χρήση σε λοιμώξεις από gram-αρνητικά παθογόνα με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (FDA 2018: Avycaz, EMA 2018).

Από την έναρξη της κλινικής χρήσης της κεφταζιδίμης-αβιμπακτάμης, έχουν λάβει χώρα αρκετές αναδρομικές μελέτες παρατήρησης της κλινικής επιτυχίας της έναντι λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, συμπεριλαμβανομένων βακτηριαιμιών, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως καλά ποσοστά κλινικής επιτυχίας (Shields et al 2016, Temkin et al. 2017) και υπεροχή έναντι άλλων θεραπειών (Shields et al 2017a, Caston et al. 2017). Σε μεγάλη συγκριτική μελέτη διαφόρων θεραπειών για βακτηριαιμία από ΚΡCΚρ, η χορήγηση κεφταζιδίμης-αβιμπακτάμης ήταν ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγων επιβίωσης (Tumbarello et al.2019).

Δυστυχώς, υπάρχουν αρκετά προβλήματα στη χρήση της κεφταζιδίμης-αβιμπακτάμης:

α) ο συνδυασμός δεν είναι δραστικός έναντι στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου MBL. Αυτές οι β-λακταμάσες αποτελούν το βασικότερο μηχανισμό αντοχής στην κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη (Castanheira et al. 2015). Μάλιστα, ειδικοί θεωρούν πιθανό οι MBLs να επικρατήσουν στο μέλλον έναντι των καρβαπενεμασών που φέρουν σερίνη (Bush 2018).

β) υπάρχουν ήδη αναφορές ανάπτυξης αντοχής σε σύντομο χρονικό διάστημα χρήσης της και επακόλουθη υποτροπή της λοίμωξης (Shields et al. 2016, Shields et al. 2017b, Tumbarello et al. 2019). Μάλιστα, η πνευμονία αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως προδιαθεσικός παράγων ανάπτυξης αντοχής στην κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη (Shields et al. 2018).

γ) Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των αναδρομικών μελετών παρατήρησης κλινικής χρήσης της κεφταζιδίμης-αβιμπακτάμης, καθώς και μίας προοπτικής μελέτης, συγκριτικής μεταξύ κεφταζιδίμης-αβιμπακτάμης και κολιστίνης έναντι λοιμώξεων από CRE, η οποία έδειξε υπεροχή της πρώτης (van Duin et al. 2018), δεν υπάρχουν τυχαίοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες (randomized controlled trials-RCTs) που να αποδεικνύουν την υπεροχή της χρήσης της στις λοιμώξεις από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Οι μελέτες φάσεως 3 που διεξήχθησαν στα πλαίσια του ελέγχου του νέου φαρμάκου δεν συμπεριέλαβαν ασθενείς με λοιμώξεις από CRE (Karaiskos et al. 2019, Wright et al. 2017). Οι ειδικοί συμφωνούν ότι η χρήση του νέου συνδυασμού πρέπει να γίνεται με περίσκεψη, ενώ η εμπειρική χρήση του στους σοβαρά ασθενείς να βασίζεται στην ύπαρξη

συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου (Tumbarello et al. 2018a). Η αλόγιστη χρήση του είναι βέβαιον ότι θα οδηγήσει σε δραματική αύξηση της αντοχής και σε αυτό το νέο παράγοντα, όπως έχει γίνει, χωρίς εξαιρέσεις, στο παρελθόν (van Duin & Bonomo 2016).

β) *Μεροπενέμη- βαμπορμπακτάμη*: Η βαμπορμπακτάμη αναστέλλει καρβαπενεμάσες τάξης A, όπως τις KPC, αλλ'όχι των τάξεων D (πχ OXA-48) και B (MBLs). Ο συνδυασμός έχει λάβει έγκριση για τη θεραπεία επιπλεγμένων ουρολοιμώξεων. Μελέτη φάσεως II που προηγήθηκε έδειξε πολύ καλή δραστηριότητα του συνδυασμού σε λοιμώξεις από CRE (Kaye et al. 2017).

Παράλληλα, υπάρχουν μερικά ακόμη αντιμικροβιακά που βρίσκονται επί του παρόντος υπό μελέτη για τη θεραπεία λοιμώξεων από CRE (Πίνακας 4.1). Περιλαμβάνουν τέσσερις ακόμη συνδυασμούς με αναστολείς, μια αμινογλυκοσίδη, μια τετρακυκλίνη και μια σιδεροφόρο κεφαλοσπορίνη, τη σεφιδεροκόλη, η οποία έχει δράση έναντι CRE που παράγουν τόσο KPC όσο και MBL καρβαπενεμάσες.

Πίνακας 4.1. Αντιβιοτικά υπό μελέτη για τη θεραπεία λοιμώξεων από CRE			
Παράγων	Τάξη	Καρβαπενεμάσες έναντι των οποίων είναι δραστικά	Καρβαπενεμάσες έναντι των οποίων είναι ανενεργά
Κεφταρολίνη-αβιμπακτάμη	Β-λακτάμη/αναστολέας β-λακταμάσης	KPC, μερικές OXA-48	MBL
Αζτρεονάμη- αβιμπακτάμη	Β-λακτάμη/αναστολέας β-λακταμάσης	KPC, OXA-48, MBL	
Ιμιπενέμη-ρελεμπακτάμη	Β-λακτάμη/αναστολέας β-λακταμάσης	KPC,/κυμαινόμενη δραστηριότητα για OXA-48	MBL
Μεροπενέμη-νακουμπακτάμη	Β-λακτάμη/αναστολέας β-λακταμάσης	KPC	
Πλαζομικίνη	Αμινογλυκοσίδη	KPC/ κυμαινόμενη δραστηριότητα για OXA-48	MBL
Εραβακυκλίνη	Τετρακυκλίνη	KPC, OXA-48, MBL	
Σεφιδερκόλη	Σιδεροφόρος κεφαλοσπορίνη	KPC, OXA-48, MBL	

Τροποποιημένος από: Tumbarello et al. 2018a.

Σχόλιο επί της παρούσης μελέτης: οι νέες, πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές που αναφέρονται ανωτέρω και που αναμένεται να δώσουν νέες προοπτικές στο δυσεπίλυτο ζήτημα της καλύτερης δυνατής θεραπείας λοιμώξεων από *K.pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες, δεν ήταν διαθέσιμες κατά το χρόνο σχεδιασμού της παρούσας μελέτης. Είναι πολύ πιθανό τα νέα φάρμακα να αντικαταστήσουν τα έως πρόσφατα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά όπως την κολιστίνη, αμινολυκοσίδες, τιγκεκυκλίνη, φωσφομυκίνη και συνδυασμούς τους, και η διερεύνηση συνέργειας μεταξύ των τελευταίων να μην έχει πλέον την ίδια βαρύτητα. Συμφώνως προς τις γνώμες των ειδικών που απαρτίζουν τη σεβαστή τριμελή συμβουλευτική επιτροπή του παρόντος πονήματος, το ζήτημα της μελέτης της *in vitro* συνέργειας μεταξύ αντιβιοτικών και της αξιολόγησης των μεθόδων που τη διεξάγουν, παραμένει επίκαιρο στο χώρο της λοιμωξιολογίας και θεραπείας παθογόνων που δε θα πάσουν ποτέ να εξελίσσονται και να διαφεύγουν της δράσης της εκάστοτε διαθέσιμης φαρμακευτικής φαρέτρας.

Κεφάλαιο 5. ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση συνδυασμού αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση μικροβιακών λοιμώξεων έχει μακρά ιστορία. Οι πρώτες παρατηρήσεις επιτυχημένου συνδυασμού αφορούν τη χορήγηση πενικιλίνης μαζί με στρεπτομυκίνη για τη θεραπεία βακτηριακής ενδοκαρδίτιδος (Hunter 1947). Ακολούθησαν διαπιστώσεις ωφέλειας για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης και την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής κατά τη θεραπεία της φυματίωσης (Levin et al. 1975, Aziza et al. 1995). Σήμερα η χορήγηση συνδυασμού αντιβιοτικών αποτελεί την ενδεδειγμένη θεραπεία για τις προαναφερθείσες λοιμώξεις. Έκτοτε, το σκεπτικό της επίτευξης βελτιωμένης δραστηριότητας των αντιβιοτικών και ευρύτερου αντιμικροβιακού φάσματος με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής έχει αποτελέσει την αιτία εκτεταμένης έρευνας για τις περισσότερες από τις σοβαρές λοιμώξεις (Eliopoulos et al. 1988). Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά μικρόβια αποτελούν αντικείμενο έντονης έρευνας στο χώρο αυτό.

5.1. Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΚΟΠΙΑ

Η αντιμετώπιση λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά αλλά και γενικότερα από gram-αρνητικά μικρόβια ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (CRE-Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*, CRGNB - Carbapenem Resistant Gram-Negative Bacteria) έχει αποτελέσει και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο ευρύτατης έρευνας, χωρίς αυτή να έχει καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα. Ο λόγος γι' αυτό είναι η έλλειψη ισχυρών αποδείξεων, με τη μορφή αποτελεσμάτων τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών μελετών (Randomized Controlled Trials, RCTs), υπέρ ή κατά της χρήσης συνδυασμένης θεραπείας (Carrara et al, 2018, Tumbarello et al. 2018a). Παρά το γεγονός αυτό, πρόσφατη μεγάλη έρευνα μεταξύ λοιμωξιολόγων από 115 πανεπιστημιακά νοσοκομεία σε Ευρώπη, Ισραήλ και ΗΠΑ, έδειξε πως η πιο δημοφιλής προσέγγιση ήταν η χρήση συνδυασμού αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (Papst et al. 2018). Επιπλέον, πάνω από τους μισούς των ερωτηθέντων δήλωσαν ότι η χρήση συνδυασμού βασίζεται σε ισχυρές επιστημονικές αποδείξεις. Η αλήθεια είναι ότι οι υπάρχουσες αποδείξεις υπέρ της χρήσης συνδυασμού αντιβιοτικών για τέτοιες λοιμώξεις προέρχονται κατά κύριο λόγο από μελέτες παρατήρησης (observational), κυρίως αναδρομικές (retrospective), οι οποίες διέπονται από υψηλό ρίσκο συστηματικού σφάλματος (bias) (Zusman et al. 2017). Βασικά μειονεκτήματα των μελετών αυτών είναι η ανακρίβεια του ορισμού της συνδυαστικής θεραπείας (σχετικά με το αν συνδυάζονται αντιβιοτικά που είναι δραστικά *in vitro*, όλα ή κάποια από αυτά, ή είναι μη δραστικά αλλά παρόλ' αυτά αναμένεται συνεργική δράση μεταξύ τους), οι διαφορές των ορίων ευαισθησίας (breakpoints) για τα αντιβιοτικά, διαφορετικοί παρεμβαλλόμενοι χρόνοι μέχρι την έναρξη της θεραπείας και διάρκεια αυτής, μικρά δείγματα ασθενών σε κάποιες από τις μελέτες, απουσία μάρτυρα για έναν ή περισσότερους συγχυτικούς παράγοντες, όπως τροποποίηση θεραπείας, και διαφορετικά κριτήρια ή χρόνος καθορισμού του τελικού κλινικού αποτελέσματος. Παρόλ' αυτά, σε σχέση με τις λοιμώξεις από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, οι μελέτες παρατήρησης που εξάγουν συμπεράσματα ευνοϊκά για τη χρήση συνδυασμού αντιβιοτικών είναι αρκετές και σημαντικές. Μερικές από αυτές φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5.1. Μελέτες παρατήρησης χορήγησης συνδυασμού αντιβιοτικών σε βακτηριαμίες από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες.

Μελέτη	Στελέχη	Είδος μελέτης	Αριθμός ασθενών/ Είδος λοίμωξης	Συμπέρασμα
Zarkotou et al. 2011	KPCKp	Προοπτική παρατήρησης	53/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δραστικών αντιβιοτικών με επιβίωση
Qureshi et al. 2012	KPCKp	Αναδρομική παρατήρησης	41/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δραστικών αντιβιοτικών με επιβίωση
Tumbarello et al. 2012	KPCKp	Αναδρομική παρατήρησης	125/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δύο ή περισσότερων εκ των: τιγκεκυκλίνη, κολιστίνη, μεροπενέμη (εφόσον δραστικά) με επιβίωση
Daikos et al. 2014	KPCKp, VIMKp	Αναδρομική παρατήρησης	205/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δύο ή περισσότερων δραστικών αντιβιοτικών με επιβίωση, κυρίως εάν περιλαμβάνετο καρβαπενέμη και η MIC ήταν ≤ 8 mg/L
Tumbarello et al. 2015	KPCKp	Αναδρομική παρατήρησης	661/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δύο ή περισσότερων δραστικών αντιβιοτικών με επιβίωση, κυρίως εάν περιλαμβάνετο μεροπενέμη και η MIC ήταν ≤ 8 mg/L
Gutierrez-Gutierrez et al. 2017	CRKp	Αναδρομική παρατήρησης	437/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού που περιλαμβάνει άνω του ενός δραστικά αντιβιοτικά με επιβίωση ασθενών σε υψηλό ρίσκο θανάτου
Machuca et al. 2017	KPCKp με αντοχή στην κολιστίνη	Προοπτική παρατήρησης	104/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού αντιβιοτικών εκτός κολιστίνης και καρβαπενέμης με επιβίωση ασθενών με σηπτικό σοκ
Giannella et al. 2018	CRKp	Αναδρομική παρατήρησης	595/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού που περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα δραστικό αντιβιοτικό και χρήση υψηλής δόσης καρβαπενέμης με επιβίωση
Medeiros et al. 2019	KPCKp	Αναδρομική παρατήρησης	82/ βακτηριαμία	Συσχέτιση χορήγησης συνδυασμού δραστικών αντιβιοτικών με επιβίωση

CRKp: *K.pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες

KPCKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC

VIMKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου VIM

Στο ίδιο συμπέρασμα υπέρ της χρήσης συνδυασμού αντιβιοτικών για λοιμώξεις από στελέχη *K. pneumoniae* ή γενικά εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες καταλήγουν αρκετές συστηματικές ανασκοπήσεις δημοσιευμένων μελετών που παρουσιάζουν κλινικά δεδομένα (Πίνακας 5.2). Στηριγμένη σε ορισμένες εξ αυτών, η Βρετανική Εταιρεία Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας εξέδωσε πρόσφατα οδηγίες για συγχορήγηση κολιστίνης με μεροπενέμη για λοιμώξεις από KPCKp με MIC στη μεροπενέμη ≤ 8 mg/L και υψηλή δόση συνεχόμενης έγχυσης σε μεγαλύτερες MIC (έως 32 mg/L), καθώς και συγχορήγηση κολιστίνης με αμινογλυκοσίδη ή τιγκεκυκλίνη σε λοιμώξεις από μικρόβια που παράγουν άλλου τύπου καρβαπενεμάσες ή είναι

ανθεκτικά στη μεροπενέμη και ευαίσθητα σε αυτά τα αντιβιοτικά (Hawkey et al. 2018). Σημειώνεται ωστόσο πως σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση που περιέλαβε και μεταανάλυση μελετών χορήγησης συνδυασμών κολιστίνης σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά μικρόβια (*A.Baumannii* συμπεριλαμβανομένων), οι συγγραφείς δεν μπόρεσαν να εξάγουν ασφαλές συμπέρασμα, λόγω της χαμηλής ποιότητας αποδεικτικών στοιχείων (Zusman et al. 2017).

Πίνακας 5.2. Ανασκοπήσεις κλινικών μελετών για τη χρήση συνδυασμού αντιβιοτικών σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά gram-αρνητικά μικρόβια.

Μελέτη	Στελέχη	Είδος μελέτης	Αριθμός ανασκοπηθέντων μελετών	Επίδραση χορήγησης συνδυασμού αντιβιοτικών στην επιβίωση
Tzouvelekis et al. 2012	KPCKp, MBLKp	Ανασκόπηση	34	Μεγάλη βελτίωση αποτελεσματικότητας τιγκεκυκλίνης και κολιστίνης όταν συνδυάζονταν μεταξύ τους ή με αμινογλυκοσίδη ή καρβαπενέμη
Tzouvelekis et al. 2014	CRE	Ανασκόπηση	20	Ευνοϊκό αποτέλεσμα συνδυασμών
Falagas et al. 2014 _b	CRE	Ανασκόπηση	20	3/20 μελέτες: Ευνοϊκό αποτέλεσμα για επιβίωση βαρέως πασχόντων ασθενών
Rafailidis et al. 2014	CRE	Ανασκόπηση	10	Ευνοϊκό αποτέλεσμα όταν ο συνδυασμός περιλαμβάνει καρβαπενέμη και η MIC \leq 8mg/L - Ευνοϊκό αποτέλεσμα από συνδυασμούς κολιστίνης, τιγκεκυκλίνης ψηλής δόσης, αμινογλυκοσίδης, φωσφομυκίνης στις άλλες περιπτώσεις
Daikos et al. 2012	KPCKp	Ανασκόπηση	30	Επιτυχέστεροι οι συνδυασμοί που περιλαμβάνουν μια <i>in vitro</i> δραστική καρβαπενέμη και μια <i>in vitro</i> δραστική αμινογλυκοσίδη ή κολιστίνη/ Μονοθεραπεία κατώτερη των συνδυασμών
Lee et al. 2012	KPCKp	Ανασκόπηση	38	Ευνοϊκό αποτέλεσμα συνδυασμών που περιλαμβάνουν μεροπενέμη ή κολιστίνη
Hirsch et al. 2010	KPCKp	Ανασκόπηση	15	Αρνητικό αποτέλεσμα μονοθεραπείας με καρβαπενέμη ή κολιστίνη
Zusman et al. 2017	CRGNB	Ανασκόπηση/ Μεταανάλυση	22	Αδυναμία εξαγωγής συμπερασμάτων λόγω χαμηλής ποιότητας αποδείξεων

CRE : Carba-penem Resistant *Enterobacteriaceae* - εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες

KPCKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC

MBLKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου MBL

CRGNB: gram-αρνητικά βακτήρια ανθεκτικά στις καρβαπενέμες

Δυστυχώς, ισχυρές αποδείξεις περί της χρήσης συνδυασμών αντιβιοτικών, με τη μορφή τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών (randomized controlled trials- RCTs), δεν υπάρχουν. Η μόνη τέτοια μελέτη σύγκρισης μονοθεραπείας, και συγκεκριμένα κολιστίνης, και συνδυασμού της με μεροπενέμη έναντι gram-αρνητικών βακτηρίων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες δεν μπόρεσε να εξάγει ασφαλή συμπεράσματα για τις λοιμώξεις εκείνες που οφείλονταν σε εντεροβακτηριακά, διότι αυτές αντιπροσώπευαν μόνον το 18% των περιστατικών από gram-αρνητικά βακτήρια που μελετήθηκαν (Paul et al.2018). Η μελέτη αυτή συμπέρανε πως ο συνδυασμός δεν υπερτερεί της μονοθεραπείας αλλά, καθώς επικεντρώθηκε σε λοιμώξεις από *Acinetobacter baumannii* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, μετέπειτα συγγραφείς κρίνουν ότι δε θα πρέπει να «κλείσει την πόρτα» στη συνδυαστική θεραπεία λοιμώξεων από άλλα μικρόβια (πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά και ψευδομονάδες), καθώς η παθοφυσιολογία τους διαφέρει (Perez & Bonomo 2018).

Κάτω από τις περιγραφείσες συνθήκες έλλειψης ισχυρών αποδείξεων, πάνελ διεθνώς αναγνωρισμένων λοιμωξιολόγων εξειδικευμένων στην αντιμετώπιση πολυανθεκτικών λοιμώξεων από ΚΡΣΚρ συνήλθε προσφάτως με σκοπό τη γνωμοδότηση επί του ζητήματος χρήσης συνδυασμού αντιβιοτικών στη βάση της προσωπικής τους γνώσης και εμπειρίας (Bassetti et al. 2018). Σύμφωνα με αυτούς, ο συνδυασμός αντιβιοτικών θα πρέπει να προτιμάται έναντι της μονοθεραπείας σε περίπτωση σοβαρών λοιμώξεων. Το ίδιο μήνυμα μεταδόθηκε και στο κοινό του πρόσφατου πανευρωπαϊκού συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωξιολογίας (ECCMID 2018), και συγκεκριμένα: «Ο συνδυασμός δύο δραστικών αντιβιοτικών σχετίζεται με βελτιωμένη επιβίωση στις λοιμώξεις υψηλού κινδύνου από εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, ενώ η μονοθεραπεία είναι πιθανά αποτελεσματική σε αυτές χαμηλού κινδύνου» (“An everyday life with XDR Gram-negative infection - empiricism versus scientific evidence”, G.L. Daikos, ECCMID 2018).

Συμπερασματικά, η εφαρμογή συνδυασμού αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από CRE αποτελεί συνήθη πρακτική. Συνακόλουθα, η επιλογή των αντιβιοτικών αυτών καθώς και η αξιολόγηση της ωφέλειας από τη συγχορήγησή τους αποκτούν ιδιαίτερη σημασία.

5.2. Η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΟΠΙΑ –ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ *in vitro* ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ

Οι περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και η υψηλή θνητότητα που χαρακτηρίζει τις λοιμώξεις που οφείλονται σε CRE, και ειδικότερα σε CRKp (*K.pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες), έχει οδηγήσει σε αναζήτηση αποτελεσματικών συνδυασμών αντιβιοτικών όχι μόνο σε κλινικό, όπως περιγράφηκε παραπάνω, αλλά και σε εργαστηριακό επίπεδο. Αυτό μεταφράζεται σε αναζήτηση *in vitro* συνέργειας μεταξύ των αντιβιοτικών, που σημαίνει διαπίστωση του κατά πόσον η συνδυασμένη δράση τους είναι μεγαλύτερη από τη δράση του κάθε αντιβιοτικού εάν χορηγούνταν μόνο του ή από το άθροισμα των δράσεών τους όταν χορηγούνται μόνα τους. Οι σύγχρονες εργαστηριακές μέθοδοι αναζήτησης συνέργειας μεταξύ αντιβιοτικών βασίζονται σε 3 κύριες μεθοδολογίες (θα περιγραφούν αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο): τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (Time-Kill Assay - ΤΚΑ), η οποία μελετά τη βακτηριοκτόνο ικανότητα των αντιβιοτικών και των συνδυασμών τους εντός ορισμένου χρόνου, τη μέθοδο της «σκακιάρας» (Checkerboard method - CB), που καθορίζει τις ανασταλτικές συγκεντρώσεις των συνδυασμών σε σύγκριση με αυτές των αντιβιοτικών μόνων τους, και τεχνικές που χρησιμοποιούν ταινίες κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικών (Etest) που επιτρέπουν τον προσδιορισμό των MIC των αντιβιοτικών και, με κατάλληλο τρόπο, και συνδυασμών τους. Από αυτές, η μέθοδος της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο θεωρείται από πολλούς ότι προσφέρει τις πιο χρήσιμες κλινικά πληροφορίες.

Οι έρευνες αναζήτησης εργαστηριακής συνέργειας μεταξύ αντιβιοτικών μπορεί να έχουν ποικίλα αποτελέσματα. Το αποτέλεσμα του συνδυασμού δύο ή περισσότερων αντιβιοτικών μπορεί, εκτός από *συνεργικό*, όπως ορίστηκε παραπάνω, να είναι *αθροιστικό*, που δηλώνει ότι προκύπτει άθροισμα των ατομικών τους δράσεων, μπορεί να είναι *αδιάφορο*, δηλαδή όχι διαφορετικό από αυτό που θα επιτυγχανόταν από το πιο δραστικό από τα αντιβιοτικά εάν χρησιμοποιούνταν μόνο του, ή ακόμα και *ανταγωνιστικό*, δηλαδή χειρότερο από ό,τι θα παραγόταν από τη χρήση ακόμη και του λιγότερο δραστικού από αυτά. Ασφαλώς το καλύτερο σενάριο είναι η επίτευξη συνέργειας. Αυτό έχει αποτελέσει και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο ευρείας έρευνας, με σκοπό την εύρεση θεραπευτικών δυνατοτήτων έναντι παθογόνων που μπορεί να είναι ανθεκτικά σε όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά.

Για την *Klebsiella pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες, έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες αναζήτησης *in vitro* συνέργειας πολυποίκιλων συνδυασμών. Τα αντιβιοτικά που έχουν δοκιμαστεί από τους διάφορους ερευνητές ανήκουν σε τάξεις με πιθανολογούμενη δραστηριότητα έναντι των μελετουμένων στελεχών, όπως διάφορες καρβαπενέμες, κολιστίνη ή πολυμυξίνη Β, διάφορες αμινογλυκοσίδες, τιγκεκυκλίνη, φωσφομυκίνη, ριφαμπικίνη ή ακόμη και κεφαλοσπορίνες τετάρτης γενεάς και κινολόνες. Οι πιο σημαντικές από αυτές φαίνονται στον Πίνακα 5.3.

Από τις υπάρχουσες *in vitro* μελέτες προκύπτουν ποικίλα αποτελέσματα από τον έλεγχο διαφόρων συνδυασμών (Πίνακας 5.3). Από τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα έδωσε ο συνδυασμός της κολιστίνης με ριφαμπικίνη, με ποσοστά συνέργειας 94% και 100% στις μελέτες των Bratu et al. και Tascini et al. καθώς και 100% για όλα τα στελέχη με αντοχή στην κολιστίνη που ελέγχθηκαν, στις μελέτες των Gaibani et al. και Maraki et al. Ο συνδυασμός κολιστίνης με τιγκεκυκλίνη έδωσε από αδιάφορα ή και ανταγωνιστικά (μελέτες Albur και Berçot) έως συνεργικά αποτελέσματα με διάφορα ποσοστά συνέργειας: 33% στη μελέτη των Maraki et al., 39% από τους Tascini et al., 64% από τους Stein et al., 100% από τους Pournaras et al., ενώ στη μελέτη των Gaibani et al. η συνέργεια, η οποία αφορούσε μόνο τα κολιστίνη ανθεκτικά στελέχη, κυμάνθηκε από 0% έως 88% ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε (0% έδωσε η ΤΚΑ, 25% η μέθοδος με Etest και 88% η μέθοδος της σκακιέρας). Ο συνδυασμός της κολιστίνης με φωσφομυκίνη έδωσε συνέργεια σε ποσοστά 36% και 12% στις μελέτες των Samonis et al. και Souli et al.

Ο συνδυασμός διαφόρων καρβαπενεμών (μεροπενέμης ή ιμιπενέμης ή ντοριπενέμης) είχε επίσης ποικίλα αποτελέσματα. Έτσι, ο συνδυασμός μιας από τις ανωτέρω με κολιστίνη έδωσε ποσοστά συνέργειας 14% (Stein et al.), 33% (Souli et al.) έως 100% (Lee et al.) και με πολυμυξίνη Β, 55% και 100% (μελέτες Pankey et al., Lee et al.). Συνδυαζόμενες με φωσφομυκίνη, 65% στη μελέτη των Souli et al., 70%-74% στη μελέτη των Samonis et al. και με αμικασίνη 100% στη μελέτη των Le et al. Ο συνδυασμός μεροπενέμης με τιγκεκυκλίνη ήταν κατά βάση αδιάφορος στις περισσότερες μελέτες (Pournaras et al., Tascini et al. και συνέργεια 14% στη μελέτη των Stein et al.).

Πίνακας 5.3. Μελέτες εκτίμησης *in vitro* αντιμικροβιακών συνδυασμών έναντι στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες

Μελέτη	Είδος στελεχών	Αριθμός στελεχών	Συνδυασμός	Μέθοδος Εκτίμησης Συνέργειας	Αποτέλεσμα
Bratu et al. 2005	KPCKp	16	PB/RIF	TKA	Θετικό (Συνέργεια 94%)
Souli et al. 2009	MBLKp	42	IMP/COL	TKA	Συνέργεια 33%
Elemam et al. 2010	KPCKp	12	PB/ είτε RIF,DOX, GN ή TIG	CB	Θετικό για PB/RIF ή DOX ή TIG, αδιάφορο για PB/GN
Berçot et al. 2011	NDMKp	28	COL/FOS, COL/TIG	CB	Αδιάφορο
Samonis et al. 2012	KPCKp	50	FOS/είτε IMP, MEM, DOR, COL, NET ή TIG	Etest	Θετικό (Συνέργεια 74%/70%/74% /36%/42%/30% αντίστοιχα)
Pournaras et al. 2011	KPCKp	8	TIG/MEM, TIG/COL	TKA	Αδιάφορο για TIG-MEM Θετικό για TIG-COL (όλα τα στελέχη)
Le et al. 2011	KPCKp	4	AM/ είτε IMP, MEM ή ETP	TKA	Θετικό για AM/IMP, AM/MEM(συνέργεια όλα τα στελέχη)- Αδιάφορο για AM/ETP
Souli et al. 2011	KPCKp	17	FOS /είτε MEM, COL ή GN	TKA	Θετικό για FOS/MEM ή COL (συνέργεια 65%, 12%) , Αδιάφορο για FOS/GN
Albur et al. 2012	NDMKp	8	TIG/COL	TKA	Αδιάφορο ή και ανταγωνιστικό
Tascini et al. 2013	KPCKp	13	COL/RIF, MEM/GN, TIG/COL, COL/GN, COL/IMP, TIG/GN, IMP/GN, COL/MEM, TIG/MEM, TIG/IMP	CB	COL/RIF: συνέργεια 100%, λοιπά: 0%-39% -Για συνδυασμούς TIG : TIG/COL, TIG/GN, TIG/MEM, TIG/IMP: συνέργεια 39%/0%/0%/0% αντίστοιχα)
Hirsch et al. 2013	KPCKp	2	DOR/AM, DOR/RIF, LEV/RIF, DOR/LEV, AM/RIF, LEV/AM	TKA	Θετικό για DOR/AM
Tangden et al. 2014a	NDMKp	4	Διάφοροι (14 συνδυασμοί)	TKA	Θετικό για RIF/MEM/COL (όλα τα στελέχη)
Lee et al. 2013	KPCKp	4	COL/DOR, PB/DOR	TKA	Θετικό (όλα τα στελέχη)
Betts et al. 2014	CRE	18	TIG/COL	CB	Θετικό: Συνέργεια 47%
Barth et al. 2015	KPCKp	2	PB/ είτε IMP, MEM ή TIG	TKA	Θετικό και για τα 2 στελέχη
Stein et al. 2015	KPCKp/ OXAKp	14	TIG/MEM, TIG/COL, TIG/COL/MEM, COL/MEM	CB	Θετικό: συνέργεια TIG/MEM, TIG/COL, TIG/COL/MEM, COL/MEM: 14%, 64%, 50%, 14% αντίστοιχα
Pankey et al. 2013	KPCKp	31	MEM/PB	TKA, Etest	Συνέργεια 55%

Gaibani et al. 2014	KPCκρ	17	COL/RIF, TIG/COL	TKA, CB, Etest	Θετικό : COL/RIF: Συνέργεια 100% για όλα τα κολιστίνη ανθεκτικά στελέχη(n=8), με όλες τις μεθόδους TIG/COL: Συνέργεια (μόνο για τα κολιστίνη ανθεκτικά στελέχη): με τη μέθοδο CB:88% με τη μέθοδο Etest: 25% με TKA: 0%
Maraki et al. 2015	KPCκρ (κολιστίνη ανθεκτικά)	30	COL/είτε RIF, TIG, DOR, FOS, IMP, GN ή MEM	CB	Θετικό: Συνέργεια COL/RIF, COL/TIG, COL/DOR, COL/FOS, COL/IMP, COL/GN, COL/MEM: 100%, 33%, 33%, 20%, 13%, 7%, 3% αντίστοιχα

KPCκρ: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC
MBLκρ:*K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου MBL
NDMκρ: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου NDM
OXAκρ: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου OXA-48
CRE : Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*
TKA: Time Kill Assay (Μέθοδος θανάτωσης στο Χρόνο)
CB: Μέθοδος Checkerboard (σακακίρας)
FEP: κεφεπίμη, MEM: μεροπενέμη, GN: γενταμικίνη, PB: πολυμυξίνη Β, RIF: ριφαμπικίνη, TIG: τιγκεκυκλίνη , COL:κολιστίνη,
FOS: φωσφομυκίνη, IMP: ιμιπενέμη, AM: αμικασίνη, DOR: ντοριπενέμη, ETP: ερταπενέμη , NET: νετιλμυκίνη, LEV: λεβοφλοξασίνη

Τα στοιχεία για τους συνδυασμούς που περιλαμβάνουν τιγκεκυκλίνη εμφανίζονται γραμμοσκιασμένα

Τα στοιχεία για συνεργικούς συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης εμφανίζονται γραμμοσκιασμένα και με κόκκινο χρώμα.

Ο συνδυασμός γενταμικίνης με τιγκεκυκλίνη (Tascini et al.) ή φωσφομυκίνη (Souli et al.) ήταν αδιάφορος ενώ με μεροπενέμη ή ιμιπενέμη έδωσε συνέργεια 23-39% και με κολιστίνη 7% (Maraki et al.).

Σημειώνεται ότι οι *in vitro* μελέτες που αναφέρονται εδώ χρησιμοποιούν την *in vitro* μέθοδο που επέλεξαν οι συγγραφείς, χωρίς αυτή να συγκρίνεται απαραίτητα με κάποια μέθοδο αναφοράς, ή, όταν αυτή χρησιμοποιείται, μπορεί να έχει εκτελεστεί μόνο για ορισμένα εκ των στελεχών που ελέγχθηκαν με τις άλλες μεθόδους. Επιπλέον, παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλομορφία στις παραμέτρους των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Σημειώνεται επίσης πως υπάρχουν αρκετές μελέτες με μικρό αριθμό δειγμάτων και τα αποτελέσματά τους είναι ενδεικτικά.

Κεφάλαιο 6. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΕΛΕΤΗ

Το παρόν πόνημα έχει ως σκοπό την *in vitro* μελέτη δυαδικών συνδυασμών της τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη έναντι στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν διαφόρους τύπους καρβαπενεμασών. Τα αντιβιοτικά αυτά αποτελούν μερικές από τις λίγες εναπομείνουσες θεραπευτικές επιλογές για λοιμώξεις από τα εν λόγω στελέχη (Giamarellou et al. 2009, Livermore et al. 2010, Carmeli et al. 2010, Tzouveleakis et al. 2012, Karaiskos et al. 2014, Daikos et al. 2014). Η επιλογή των 5 αντιβιοτικών που αναφέρθηκαν έχει ως υπόβαθρο κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα, όπως αυτά προκύπτουν από τη μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Παρακάτω παρουσιάζονται στοιχεία που δικαιολογούν την καταλληλότητα αλλά και την ανάγκη μελέτης συνδυασμών που περιλαμβάνουν τα εν λόγω αντιβιοτικά.

6.1. Τιγκεκυκλίνη

Κλινικά δεδομένα

Η τιγκεκυκλίνη είναι από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα διεθνώς φάρμακα ως συστατικό αντιμικροβιακών συνδυασμών έναντι gram-αρνητικών παθογόνων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (Papst et al. 2018). Είναι επίσης ένα από τα συνηθέστερα συστατικά «επιτυχημένων» συνδυασμών που σχετίστηκαν θετικά με αυξημένη επιβίωση των ασθενών σε αρκετές κλινικές μελέτες παρατήρησης (Πίνακας 5.1). Μελέτη των Tumbarello et al. κατέληξε ότι ο τριπλός συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη και μεροπενέμη ήταν ο ευνοϊκότερος για την επιβίωση των ασθενών (Tumbarello et al. 2012). Στη μελέτη των Zarkotou et al. το πιο κοινό σχήμα ήταν συνδυασμός κολιστίνης/τιγκεκυκλίνης και σε αυτήν των Qureshi et al., ο συνδυασμός κολιστίνης ή τιγκεκυκλίνης με μια καρβαπενέμη (Zarkotou et al. 2011, Qureshi et al. 2012). Στη μελέτη των Gutierrez-Gutierrez et al. ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη ή αμινογλυκοσίδη ήταν από τους συνηθέστερους (31% και 35% των ασθενών αντίστοιχα) (Gutierrez-Gutierrez et al. 2017). Σε αυτήν των Machuca et al., όπου μελετήθηκαν ασθενείς με λοιμώξεις από ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη, δοκιμάστηκαν σχήματα χωρίς κολιστίνη ή καρβαπενέμες, και τα θετικά αποτελέσματα για την επιβίωση των ασθενών προέκυψαν από συνδυασμούς της τιγκεκυκλίνης, της γενταμικίνης και της φωσφομυκίνης (Machuca et al. 2017).

Η τιγκεκυκλίνη παρουσιάζει φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές ιδιότητες που ευνοούν τη χρήση της μέσα σε συνδυασμούς με άλλα αντιβιοτικά. Πρόκειται για ένα φάρμακο με βακτηριοστατικό παρά βακτηριοκτόνο χαρακτήρα. Οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται με τα συνήθη δοσολογικά σχήματα δεν φτάνουν εύκολα τις επιθυμητές - λαμβάνοντας υπόψιν και την MIC του μικροοργανισμού - σε αρκετές ανατομικές περιοχές (Tzouveleakis et al. 2012). Έχει μεγάλο όγκο κατανομής και συγκεντρώνεται γρήγορα σε διάφορους ιστούς. Παρότι δημιουργεί ικανοποιητικά επίπεδα στη χολή, χοληδόχο κύστη, εντερικό τοίχωμα και λευκά αιμοσφαίρια, οι στάθμες είναι χαμηλές στον ορό, το υγρό που επαλείφει το κυψελιδικό επιθήλιο και τα ούρα (Karaiskos et al. 2014). Ίσως εκεί να οφείλεται η αναφερόμενη ανεπάρκειά της σε περιπτώσεις βακτηριαιμίας και πνευμονίας από αναπνευστήρα. Τωόντι, συστηματικές ανασκοπήσεις και μεταανάλυσεις έδειξαν ότι η μονοθεραπεία με τιγκεκυκλίνη σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα σε σοβαρές λοιμώξεις (Cai et al. 2011, Yahav et al. 2011). Το FDA έχει εκδόσει δύο προειδοποιήσεις για αυξημένο κίνδυνο θανάτου από τη χρήση τιγκεκυκλίνης, κυρίως σε περιπτώσεις πνευμονίας από αναπνευστήρα (ventilator-associated pneumonia-VAP) (FDA 2010, FDA 2013).

Από την άλλη, υπάρχουν σαφή κλινικά στοιχεία υπέρ της χρήσης της τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό με άλλα δραστικά αντιβιοτικά. Μεγάλη ανασκόπηση 34 δημοσιευμένων μελετών βρήκε υψηλά επίπεδα αποτυχίας της μονοθεραπείας με τιγκεκυκλίνη, συγκρίσιμα με αυτά που προέκυψαν από τη χρήση ακατάλληλης θεραπείας, αλλά που βελτιώνονταν σημαντικά εάν στο σχήμα προστίθετο κολιστίνη, αμινογλυκοσίδη ή μεροπενέμη (για περιπτώσεις με MIC στη μεροπενέμη $\leq 4\text{mg/l}$) (Tzouveleakis et al. 2012). Επιπλέον, πρόσφατη μεταανάλυση 21 μελετών, ενώ δε βρήκε σημαντικές διαφορές στη θνητότητα μεταξύ ασθενών με λοιμώξεις από CRE που έλαβαν τιγκεκυκλίνη και άλλων που θεραπεύτηκαν με άλλα αντιβιοτικά, βρήκε ωστόσο βελτιωμένη επιβίωση όταν το θεραπευτικό σχήμα συνίστατο σε συνδυασμό φαρμάκων και περιλάμβανε τιγκεκυκλίνη (Ni et al. 2016).

Φαίνεται λοιπόν πως ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με άλλα δραστικά φάρμακα αναστρέφει τον κίνδυνο αυξημένης θνητότητας που επιφέρει η μονοθεραπεία με αυτήν και τη μετατρέπει σε ωφέλεια για την επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από πολυανθεκτικές λοιμώξεις.

Εργαστηριακά δεδομένα

Στον Πίνακα 5.3 φαίνονται με κόκκινα στοιχεία περιπτώσεις εργαστηριακής ανεύρεσης συνέργειας αντιμικροβιακών συνδυασμών με τιγκεκυκλίνη από διάφορες δημοσιευμένες μελέτες. Τα αποτελέσματα είναι ποικίλα, με πιο ενθαρρυντικά αυτά των Rounaras et al, που βρήκαν συνεργικές αλληλεπιδράσεις της τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη σε όλα (n=8) τα στελέχη ΚΡCΚρ που μελέτησαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Time-kill, και των Stein et al. που βρήκαν συνέργεια για τον ίδιο συνδυασμό σε ποσοστό 64% με τη μέθοδο checkerboard για στελέχη ΚΡCΚρ και ΟΧΑΚρ (Πίνακας 5.3). *In vivo* μελέτες συνδυασμών της τιγκεκυκλίνης σε ζωικά μοντέλα έχουν επίσης δώσει συνεργικά αποτελέσματα. Μελέτη του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης με γενταμικίνη ή ριφαμπικίνη μετά πρόκληση μόλυνσης μαλακών μοριών σε ποντίκια με στελέχη ΚΡCΚρ, έδειξε συνεργική δράση έναντι των περισσότερων στελεχών (Michail et al. 2013). Παρομοίως, ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με πολυμυξίνη είχε ευνοϊκή δράση στην επιβίωση 80 ποντικών μετά μόλυνση με στέλεχος ΚΡCΚρ εν σχέσει με τη μονοθεραπεία με τιγκεκυκλίνη ή πολυμυξίνη (Toledo et al. 2015). Πλεονεκτική δράση είχε και ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη σε σχέση με τη χορήγηση μόνο τιγκεκυκλίνης και σε άλλο ζωικό μοντέλο, αυτό της *Galleria mellonella* (Betts et al. 2014).

Συμφώνως προς τα ανωτέρω κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα, η τιγκεκυκλίνη διαφαίνεται ως κατάλληλο αντικείμενο προς έρευνα αλληλεπίδρασής της με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες έναντι στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες.

6.2. Κολιστίνη

Κλινικά δεδομένα

Παραπάνω έγινε αναφορά σε κλινικές μελέτες παρατήρησης που βρήκαν ευνοϊκά αποτελέσματα της συγχορήγησης κολιστίνης με άλλα αντιμικροβιακά σε λοιμώξεις από *K.pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες (Zarkotou et al. 2011, Qureshi et al. 2012, Tumbarello et al. 2012), καθώς και σε ανασκοπήσεις κλινικών μελετών που καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα (Tzouveleki et al. 2012, Daikos et al. 2012). Η κολιστίνη έχει θέση, όπως ελέχθη ανωτέρω, στις συστάσεις περί της θεραπείας των

λοιμώξεων αυτών από τη Βρετανική Εταιρεία Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας (Hawkey et al. 2018).

Από τα εργαστηριακά δεδομένα, ήδη σχολιάστηκαν επιτυχημένοι *in vitro* συνδυασμοί της κολιστίνης με τη ριφαμπικίνη και την τιγκεκυκλίνη, καθώς και, σε μικρότερο βαθμό, με τη φωσφομυκίνη και την ιμιπενέμη ή τη μεροπενέμη (Πίνακας 5.3). Σε μεταανάλυση δημοσιευμένων μελετών για την *in vitro* συνέργεια κολιστίνης ή πολυμυξίνης Β με καρβαπενέμες έναντι διαφόρων gram-αρνητικών βακτηρίων, βρέθηκε συνολικό ποσοστό συνέργειας, για τις *K. pneumoniae*, που ανέρχεται στο 47% (Zusman et al. 2013).

Σε θεωρητική βάση, η χορήγηση κολιστίνης στα πλαίσια συνδυασμών, θεωρείται σκόπιμη λόγω του φαινομένου της ετεροαντοχής, που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ανθεκτικών μικροβιακών υποπληθυσμών (Karaiskos et al. 2017). Έτσι, συγχορήγησή της με άλλο δραστικό αντιβιοτικό ελπίζεται πως θα εξοντώσει τους υποπληθυσμούς αυτούς. Η κολιστίνη εμφανίζει υψηλή τιμή «συγκέντρωσης αποτροπής μετάλλαξης» (Mutant Prevention Concentration-MPV), και ως εκ τούτου συνδυασμός της με άλλα φάρμακα θεωρείται επωφελής για την αποτροπή ή επιβράδυνση της εμφάνισης αντοχής σε αυτήν (μείωση της MPV) (Choi et al. 2014).

Από μηχανικής απόψεως, η κολιστίνη διαταράσσει την ακεραιότητα της εξωτερικής μεμβράνης των gram-αρνητικών βακτηρίων, διευκολύνοντας την είσοδο στο κύτταρο άλλων αντιβιοτικών (Betts et al. 2014). Αυτό ίσως να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητας των τελευταίων.

6.3. Γενταμικίνη

Η γενταμικίνη έχει επίσης δοκιμαστεί ευρέως σαν μέρος θεραπευτικών συνδυασμών για τις εν λόγω λοιμώξεις. Οι Daikos et al. προτείνουν έναν αλγόριθμο ως βάση της θεραπευτικής στρατηγικής για βακτηριαμίες από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες, ο οποίος βασίζεται στις τιμές MIC σε μεροπενέμη και αμινογλυκοσίδες: εάν η MIC για τη μεροπενέμη είναι μικρότερη από 4 mg/L και υπάρχει ευαισθησία σε κάποια αμινογλυκοσίδα, τότε συνιστάται η χρήση συνδυασμού τους. Εάν είναι μεγαλύτερη από 4 mg/L αλλά υπάρχει δραστική αμινογλυκοσίδα, τότε συνιστάται η χρήση συνδυασμού της τελευταίας με κάποιο

άλλο *in vitro* ενεργό αντιβιοτικό (Daikos et al. 2012). Η γενταμικίνη αποτελεί τη δραστικότερη από τις αμινογλυκοσίδες για τα CRE (Perez et al 2016), παρ'ότι αυτό είναι σπάνιο για τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση τύπου NDM (Pitout et al. 2015). Μια κλινική αναδρομική μελέτη ασθενών με σήψη εξαιτίας *K. pneumoniae* ανθεκτικής σε καρβαπενέμες και κολιστίνη βρήκε συσχέτιση της χρήσης γενταμικίνης με βελτίωση της επιβίωσης (Gonzalez et al. 2015).

6.4. Φωσφομυκίνη

Η φωσφομυκίνη είναι ένας παράγοντας με καλή *in vitro* δραστικότητα έναντι στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (Endimiani et al. 2010), καθώς επίσης και XDR (extensively drug-resistant) στελεχών (Falagas et al. 2010). Έτσι, παρ'ότι έχει ως κύρια ένδειξη τη θεραπεία λοιμώξεων του κατωτέρου ουροποιητικού, έχει δοκιμαστεί σε δύο προοπτικές κλινικές μελέτες ως μέρος συνδυασμού αντιβιοτικών για λοιμώξεις από τα εν λόγω στελέχη σε σοβαρά ασθενείς που νοσηλεύονταν σε μονάδες εντατικής θεραπείας, με ευνοϊκά αποτελέσματα (Michalopoulos et al. 2010, Pontikis et al. 2014). Στη δεύτερη περιελήφθηκε και συνδυασμός φωσφομυκίνης/τιγκεκυκλίνης.

Η φωσφομυκίνη είναι ακόμη ένας παράγοντας κατάλληλος για συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά, εξαιτίας ανάπτυξης αντοχής στην περίπτωση μονοθεραπείας (Zavascki et al. 2013, Karageorgopoulos et al. 2012_a). Είναι γνωστό το φαινόμενο της γρήγορης ανάπτυξης ανθεκτικών μεταλλαγμένων στελεχών κατά τη διάρκεια θεραπείας με φωσφομυκίνη (Nilsson et al. 2003), και έχει καταγραφεί υψηλή συχνότητα τέτοιας ανάπτυξης αντοχής κυρίως *in vitro* αλλά και από κλινικές μελέτες (Grabein et al. 2017, Karageorgopoulos et al. 2012_b). *In vitro* μελέτη έδειξε πως συνδυασμός της φωσφομυκίνης με άλλα αντιμικροβιακά έναντι KPC/Kr στελεχών είχε ως αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής στη φωσφομυκίνη, η οποία προέκυπτε, σε όλα τα στελέχη, από την επίδραση της φωσφομυκίνης μόνης της (Souli et al. 2011). Ανάμεσα στις συστάσεις του πρόσφατου Πανευρωπαϊκού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωξιολογίας (ECCMID 2018) ήταν και αυτή για χρήση της φωσφομυκίνης για συστηματικές λοιμώξεις πάντα σε συνδυασμό με άλλον ενεργό αντιμικροβιακό παράγοντα : “fosfomycin for systemic infections (at a dose of) 6g iv q 6 h, always in combination with another active agent” (“An everyday life with XDR

Gram-negative infection-empiricism versus scientific evidence”, G.L. Daikos, ECCMID 2018).

Η *in vitro* μελέτη των Souli et al. ανέδειξε συνεργικά αποτελέσματα της φωσφομυκίνης με άλλα αντιμικροβιακά, όπως και αυτή των Samonis et al. και Maraki et al. (Πίνακας 5.3).

6.5. Μεροπενέμη

Η μεροπενέμη αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης ως συστατικό συνδυασμού, εξαιτίας της σπουδαίας - αν και παραδόξου, για βακτήρια που χαρακτηρίζονται ως «ανθεκτικά τις καρβαπενέμες» - θέσης της στην κλινική πράξη. Μεγάλες μελέτες παρατήρησης κατέδειξαν την ανωτερότητα σχημάτων που περιέχουν καρβαπενέμη για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων, όπως βακτηριαμιών, από ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* (CRKp) (Tumbarello et al. 2012, Daikos et al. 2014, Tumbarello et al. 2015). Βασικό εύρημα των μελετών αυτών ήταν η ωφέλεια στην επιβίωση όταν η MIC για τη μεροπενέμη ήταν $\leq 8\text{mg/L}$. Πρόσφατες μελέτες συνδυασμού κλινικής παρατήρησης και φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής ανεβάζουν τα θεραπεύσιμα - με χρήση μεροπενέμης - όρια της MIC στα 32 (Del Bono et al. 2017) ή ακόμα και στα 64 mg/L (Cojutti et al. 2017, Pea et al. 2017), αξιοποιώντας τη δυναμική υψηλής δόσης συνεχόμενης ή εκτεταμένης έγχυσης μεροπενέμης με παρακολούθηση των σταθμών του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο (real-time therapeutic drug monitoring). Σε σύμπλευση με τα ανωτέρω, πρόσφατη μεγάλη αναδρομική μελέτη παρατήρησης πάνω στην επίδραση σχημάτων με υψηλή δόση καρβαπενέμης για βακτηριαμιές από CRKp βρήκε συσχέτιση με καλύτερη επιβίωση, όταν το 77% των υπευθύνων στελεχών παρουσίαζαν $\text{MIC} \geq 16\text{mg/L}$ (Giannella et al. 2018).

Από το χώρο των *in vitro* μελετών αναζήτησης συνέργειας της μεροπενέμης με άλλα αντιμικροβιακά, υπάρχουν ποικίλα αποτελέσματα (Πίνακας 5.3). Ωστόσο, οι πρόσφατες φαρμακοκινητικές θεωρήσεις επεκτείνουν τα περιθώρια αναζήτησης πιθανών συνεργικών αλληλεπιδράσεων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στη μελέτη περιελήφθηκαν 26 στελέχη *K. pneumoniae* που προέρχονται από κλινικά δείγματα διαφορετικών ασθενών νοσηλευθέντων σε 9 ελληνικά νοσοκομεία και συγκεκριμένα: α) Νοσοκομείο «Λαϊκόν»: πρόκειται για δείγματα απομονωθέντα από ασθενείς με βακτηριαμία και διατηρηθέντα στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής «Γ. Κ. Δαΐκος». β) Νοσοκομεία: «ΥΓΕΙΑ», «ΑΤΤΙΚΟΝ», «ΚΑΤ», «ΘΡΙΑΣΙΟ», Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ», Ογκολογικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΘΕΑΓΕΝΕΙΟ» και Πανεπιστημιακά Νοσοκομεία Λάρισας και Ηρακλείου: πρόκειται για δείγματα που περιελήφθηκαν σε πολυκεντρική μελέτη που διενεργήθηκε στην επικράτεια με σκοπό τη μελέτη της επιδημιολογίας των κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στην Ελλάδα κατά τα έτη 2014-2016 (Galani et al. 2018). Τα τελευταία προήλθαν από ασθενείς με βακτηριαμία ή ουρολοίμωξη. Όλα τα στελέχη φυλάχθηκαν στους -80°C σε ζωμό Luria Bertani (LB) εμπλουτισμένο με γλυκερόλη 20%. Τυποποιήθηκαν αρχικώς με το σύστημα τυποποίησης του νοσοκομείου προέλευσής τους και επιβεβαίωση έγινε με το σύστημα MALDI-TOF MS (bioMerieux Inc.) στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων του νοσοκομείου «Υγεία». Προ του ελέγχου ανακαλλιεργήθηκαν σε άγαρ Mac Conckey (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD). Έγγραφη συναίνεση από τους ασθενείς δεν αποκτήθηκε καθώς δεν έλαβαν χώρα θεραπευτικές παρεμβάσεις.

7.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Ο έλεγχος ευαισθησίας για τα αντιβιοτικά: αμικικιλίνη/σουλμπακτάμη, πιπερασιλλίνη/ταζομπακτάμη, κεφοξιτίνη, κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη, κεφεπίμη, αζτρεονάμη, ιμιπενέμη, αμικασίνη, σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη και τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη έγινε με το σύστημα VITEK2 (bioMerieux Inc.). Για τα αντιβιοτικά μεροπενέμη, γενταμικίνη, τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη ο

προσδιορισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) έγινε με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method, BMD) (μέθοδος αναφοράς), όπως περιγράφεται από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2015). Οι φαρμακευτικές ουσίες υδρική τιγκεκυκλίνη (Tigecycline hydrate - PZ0021), άλας θειούχου κολιστίνης (Colistin sulfate salt - C4461), τριωδρική μεροπενέμη (Meropenem trihydrate - M2574) και θειούχος γενταμικίνη (Gentamicin sulfate - G1914) για τη διεξαγωγή της BMD αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Διάλυμα της κάθε ουσίας παρασκευάστηκε σε απιονισμένο νερό, αποστειρώθηκε και διατηρήθηκε στους -70°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Το αρχικό μικροβιακό εναιώρημα παρασκευάστηκε λαμβάνοντας 3-5 αποικίες από ανακαλλιέργημα 16-20 ωρών σε άγαρ Mac Conkey και διαλύοντας αυτές σε 5 ml θρεπτικού ζωμού Mueller Hinton. Αυτό προσαρμόστηκε σε θολρότητα 0.5 της κλίμακας McFarland και αραιώθηκε ώστε το τελικό εναιώρημα να περιέχει 0.5×10^5 έως 2.5×10^5 CFU/ml. Με αυτό ενοφθαλμίστηκαν πλάκες μικροτιλοδότησης που επώαστηκαν στους $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Οι MICs προσδιορίστηκαν και καταγράφηκαν σε 16-24 ώρες. Ως MIC καθορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που ανέστειλε πλήρως την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Για τη φωσφομυκίνη ο προσδιορισμός της MIC έγινε με χρήση ταινίας κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικού (Etest), καθώς η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό δεν είναι αξιόπιστη για τον προσδιορισμό της MIC του αντιβιοτικού αυτού. Έλεγχος ποιότητας (Quality control testing) έγινε με τα πρότυπα στελέχη *Escherichia coli* ATCC 25922 και *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Για τα αντιβιοτικά μεροπενέμη, γενταμικίνη, τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη προσδιορισμός της MIC έγινε και με τη μέθοδο Etest προκειμένου να εξυπηρετηθούν οι μεθοδολογίες μελέτης συνέργειας αντιβιοτικών που στηρίζονται στη χρήση Etest, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Οι ταινίες Etest αγοράστηκαν από την εταιρεία bioMérieux, Inc. και διαβάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι MICs καθορίστηκαν εις τριπλούν και χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές. Για τα αντιβιοτικά μεροπενέμη, κολιστίνη και γενταμικίνη η MIC καθορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλούσε πλήρη αναστολή της ορατής ανάπτυξης και για την τιγκεκυκλίνη εκείνη που προκαλούσε 80% αναστολή ανάπτυξης (αγνοώντας διάσπαρτες μικροαποικίες). Για τη φωσφομυκίνη αγνοήθηκαν όλες οι

μεμονωμένες αποικίες εντός της ελλειπτικής ζώνης αναστολής, σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες της EUCAST (EUCAST a).

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων όλων των ανωτέρω μεθόδων έγινε σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας που προτείνει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τον Έλεγχο Αντιμικροβιακής Ευαισθησίας (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST v 8.1) (EUCAST a).

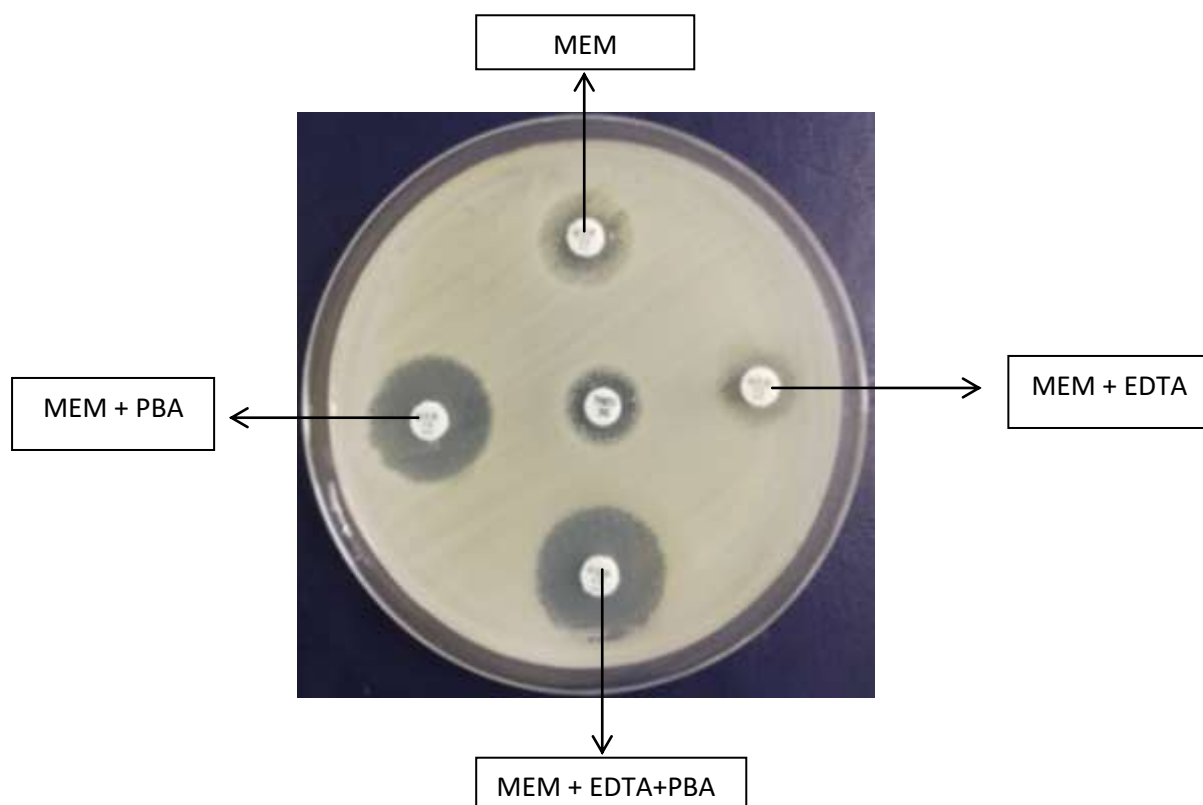
Χρήση Etest κολιστίνης

Το 2016 η EUCAST εξέδωσε οδηγία με την οποία συστήνει όπως ο προσδιορισμός της MIC για την κολιστίνη να γίνεται με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method, BMD), ενώ αποτρέπει από τη χρήση άλλων μεθόδων και μεταξύ αυτών και του Etest (EUCAST c). Τούτο έλαβε χώρα μετά το σχεδιασμό της παρούσης μελέτης και κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της. Η χρήση Etest έγινε, όπως προειπώθηκε, για να εξυπηρετηθεί η μελέτη των αντιστοίχων μεθοδολογιών προσδιορισμού συνεργείας αντιβιοτικών και όχι για να καθοριστεί η MIC των μελετουμένων αντιβιοτικών, ο προσδιορισμός της οποίας έγινε, όπως ελέχθη ανωτέρω, με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων, έγινε σύγκριση των τιμών MIC κολιστίνης που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους (BMD και Etest). Τα αποτελέσματα και η ερμηνεία τους δίνονται στο κεφάλαιο 8 («ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ»).

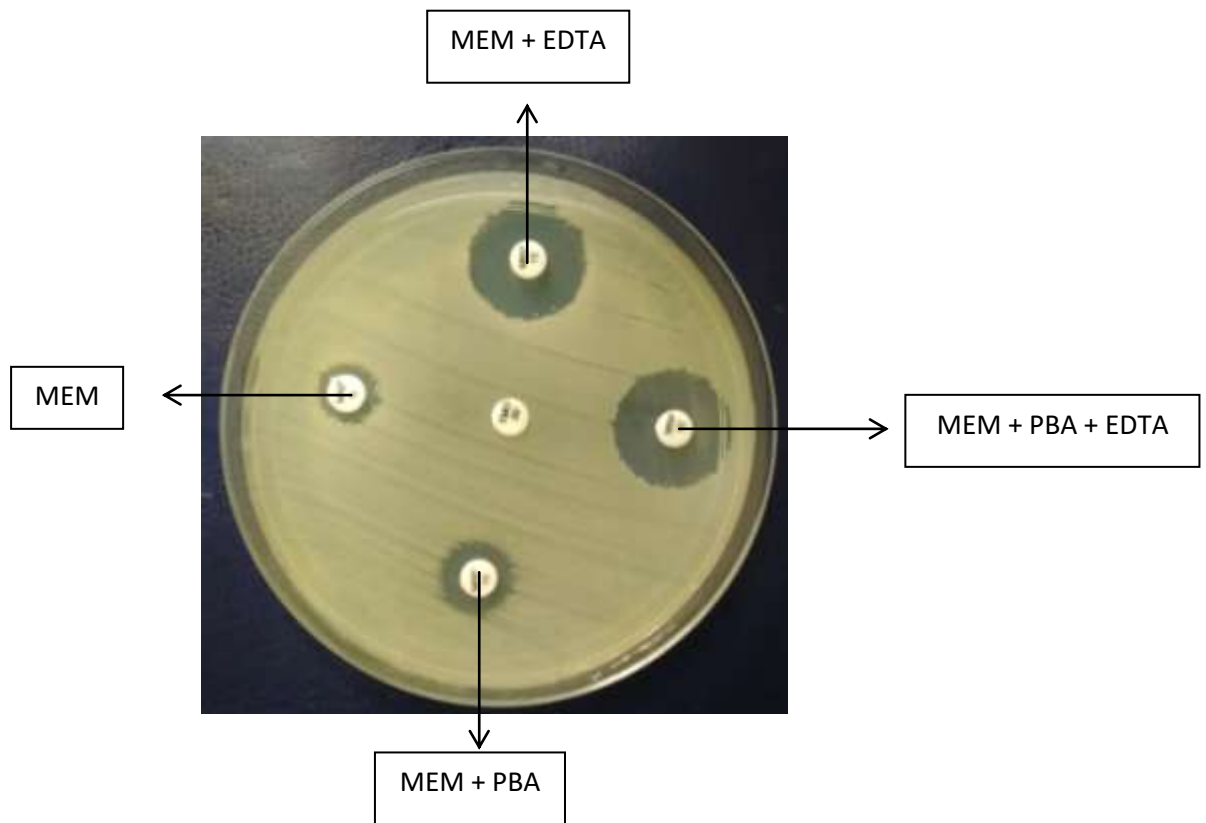
7.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Για τη διαλογή στελεχών καταλλήλων για το παρόν πόνημα διενεργήθηκε φαινοτυπικός έλεγχος προς διαπίστωση παραγωγής καρβαπενεμάσης καθώς και του είδους αυτής. Η επιβεβαίωση έγινε με μοριακές μεθόδους, όπως θα περιγραφεί περαιτέρω. Ο φαινοτυπικός έλεγχος έγινε με βάση τις οδηγίες της EUCAST (EUCAST b). Επιστρώθηκαν τριβλία με άγαρ Mueller Hinton με εναιώρημα κάθε στελέχους θολερότητας 0.5 της κλίμακος McFarland. Επί της επιφανείας κάθε τριβλίου τοποθετήθηκαν δισκία μεροπενέμης (Oxoid) συνδυασμένης με διαφόρους αναστολείς καρβαπενεμασών, ως εξής: δισκίο μεροπενέμης περιεκτικότητας 10 μg, δισκίο μεροπενέμης 10 μg συνδυασμένης με 400μg φαινυλβορονικού οξέος (PBA), δισκίο μεροπενέμης 10 μg συνδυασμένης με 292 μg (10 μl 0.1 M) EDTA και δισκίο

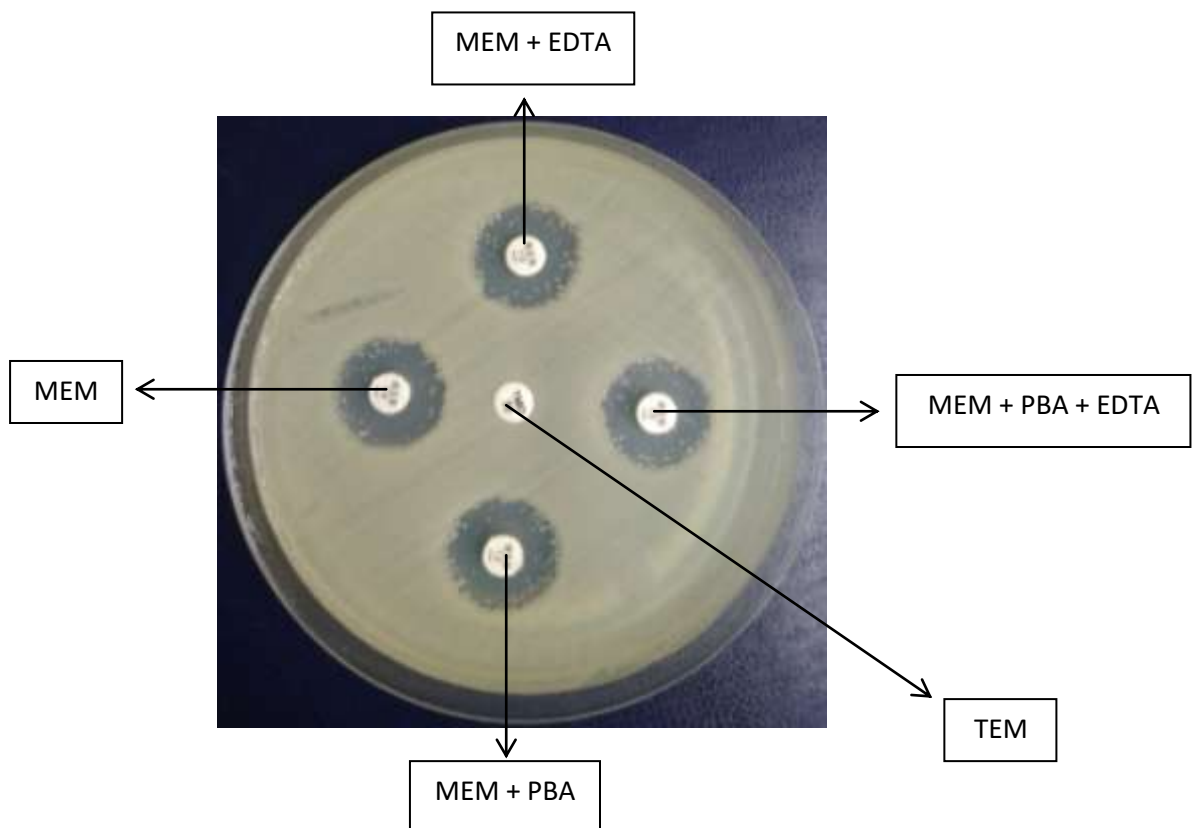
μεροπενέμης 10 μg συνδυασμένης και με τους δύο αναστολείς (PBA & EDTA) (Tsakris et al. 2010). Στην επιστρωμένη επιφάνεια τοποθετήθηκε επίσης δισκίο τεμοσιλλίνης 30 μg (Oxoid). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 37° C. Διαφορά της διαμέτρου αναστολής κατά ≥ 5 mm μεταξύ των δισκίων που περιείχαν PBA και αυτού που περιείχε μόνο μεροπενέμη ερμηνεύτηκε ως δηλωτική παρουσίας καρβαπενεμάσης τύπου KPC (Εικόνα 7.1), διαφορά ≥ 5 mm μεταξύ των δισκίων με EDTA και αυτού με απλή μεροπενέμη ως παρουσία καρβαπενεμάσης τύπου MBL (Εικόνα 7.2), ενώ διαφορά ≥ 5 mm μεταξύ μόνον του δισκίου και με τους δύο αναστολείς και των υπολοίπων, θα ερμηνευόταν ως δηλωτική συνυπάρξεως και των δύο τύπων ενζύμων (Tsakris et al. 2010). Απουσία διαφοράς διαμέτρου αναστολής ≥ 5 mm μεταξύ των δισκίων μεροπενέμης και συνδυασμών της με αναστολείς με ταυτόχρονη ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο τεμοσιλλίνης ≤ 10 mm, ερμηνεύτηκε ως ένδειξη παρουσίας καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48 (Εικόνα 7.3) (van Dijk et al. 2013).



Εικόνα 7.1. Φαινότυπος συμβατός με παρουσία καρβαπενεμάσης τύπου KPC.



Εικόνα 7.2. Φαινότυπος συμβατός με παρουσία καρβαπενεμάσης τύπου MBL.



Εικόνα 7.3. Φαινότυπος συμβατός με παρουσία καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48

7.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.4.1. Ανίχνευση καρβαπενεμασών με τη μέθοδο της PCR

Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Για την απομόνωση ολικού γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleospin Tissue της Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Αντίδραση PCR

Οι PCR αντιδράσεις έγιναν σύμφωνα με τον Πίνακα 7.1 και τους κατάλληλους εκκινητές που περιγράφονται στον Πίνακα 7.2. Σε κάθε αντίδραση PCR ταυτόχρονα με τα υπό εξέταση DNA τοποθετούνταν δύο δείγματα μάρτυρες, ένας θετικός και ένας αρνητικός στον οποίο το DNA είχε αντικατασταθεί με νερό. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Πίνακας 7.1. PCR για την ανίχνευση γονιδίων β-λακταμασών ή αλληλουχιών REP.	
<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Ποσότητα</i>
DNA	5 µl
Primer-F 10µM	2.5µl
Primer-R 10µM	2.5µl
ThermoPol Buffer 10X (µε MgCl ₂)	2.5µl
dNTPs 200 µM (each)	2.5µl
H ₂ O	9.75µl
Taq polymerase 5U/µl	0.25 µl

Πίνακας 7.2. Αλληλουχίες εκκινητών για δοκιμασίες simplex PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβαπενεμασών και duplex PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *mcr1/2* στην *K.pneumoniae*.

Όνομα PCR	Γονίδιο-στόχος	Τύπος εκκινητού	Αλληλουχία (κατεύθυνση 5' προς 3')	Μήκος (βάσεις)	Μέγεθος προϊόντος, bp	Tm σε °C	Παραπομπές
KPC	<i>bla</i> _{KPC} type	KPC-F	ATGCTACTGTATCGCCGTCT	20	893	57	Bradford et al.2004
		KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	20			
OXA-48	<i>bla</i> _{OXA-48} .like ^a	OXA-48-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	20	743	57	Poirel et al. 2004b
		OXA-48-R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC	21			
VIM	<i>bla</i> _{VIM} type VIM-1, VIM-4, VIM-12, VIM-19, VIM-26, VIM-27, VIM-39	VIM-F	ATGGTGTGGTTCGCATATC	20	509	56	Poirel et al. 2000
		VIM-R	TGGGCCATTGAGCCAGATC	19			
NDM	<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-F	GAAGCTGAGCACCGCATTAG	20	758	57	Sidjabat et al. 2011
		NDM-R	GGGCCGTATGAGTGA	18			
IMP	<i>bla</i> _{IMP} variants IMP-1, IMP-3-6, IMP-10, IMP-25-26, IMP-28-30, IMP-34	IMP-F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	20	587	58	Senda et al. 1996
		IMP-R	AACCAGTTTTGCCTTACCAT	20			
Duplex-MCR	<i>mcr-1</i>	CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	18	309	58	Liu et al.2016
		CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG	18			
	<i>mcr-2</i>	MCR2-IF	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	20	567		Xavier et al.2016
		MCR2-IR	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	21			
REP-PCR	Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες	REP-1	IIIGCGCCGICATCAGGC	18	ποικίλο	40	Versalovic et al.1991
		REP-2	ACGTCTTATCAGGCCTAC	18			

^a Όλοι οι γνωστοί σήμερα τύποι OXA-48 (*bla*_{OXA-48b}; *bla*_{OXA-162}; *bla*_{OXA-163}; *bla*_{OXA-181}; *bla*_{OXA-204}; *bla*_{OXA-232}; *bla*_{OXA-244}; *bla*_{OXA-245}; *bla*_{OXA-247}; *bla*_{OXA-405}) ανιχνεύονται από τους εκκινητές αυτούς.

7.4.2. Ανίχνευση πλασμιδιακού γονιδίου *mcr* με τη μέθοδο της PCR

Η αντίδραση PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *mcr*, που προσδίδει αντοχή στην κολιστίνη και εδράζεται σε πλασμίδιο, έγινε με τη χρήση δυο ζευγών εκκινητών (duplex-PCR) και τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 7.2.

7.4.3. Επιδημιολογική τυποποίηση βακτηριακών στελεχών

Η επιδημιολογική τυποποίηση πραγματοποιήθηκε με REP-PCR η οποία αποτελεί μια τεχνική βασισμένη στην PCR, χρησιμοποιεί κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές και βασίζεται στις επαναλαμβανόμενες εξωγονιδιακές παλίνδρομες αλληλουχίες του DNA (Versalovic et al, 1991). Η REP-PCR έγινε σύμφωνα με τον Πίνακα 7.1 και τη χρήση των εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περιγράφονται στον Πίνακα 7.2. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%. Οι ζώνες της ηλεκτροφόρησης, μεγέθους μικρότερου των 6,6Kb, από το κάθε στέλεχος συγκρίθηκαν οπτικά μεταξύ τους. Θεωρήθηκαν διαφορετικά τα στελέχη εκείνα που το ηλεκτροφορητικό τους πρότυπο διέφερε σε περισσότερες από μια ζώνες, ανεξάρτητα από την ένταση των ζωνών.

7.5. ΜΕΛΕΤΗ *in vitro* ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ)

Χρησιμοποιήθηκαν 3 μεθοδολογίες:

7.5.1. Μέθοδος της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Time Kill Assay-TKA).

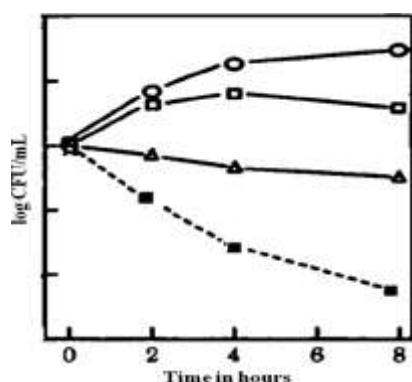
Η μέθοδος αυτή αποτελεί παράγωγο της μεθόδου προσδιορισμού της Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκέντρωσης (Minimal Bactericidal Concentration - MBC) ενός αντιβιοτικού. Προσαρμοσμένη στους σκοπούς της μελέτης συνδυασμών αντιβιοτικών, η ΚΘΧ συγκρίνει τη βακτηριοκτόνο δράση των αντιβιοτικών ενός μελετώμενου συνδυασμού κατά μόνας και συνυπαρχόντων σε ένα συνδυασμό, στη διάρκεια 24 ωρών. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι συνδυασμοί τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη έναντι των επιλεγμένων στελεχών.

Για τα πειράματα με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικός ζωμός Mueller-Hinton II (cation supplemented -CSMHB), τριβλία με άγαρ Mac Conckey (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) και καθαρές ουσίες τιγκεκυκλίνης (Tigecycline hydrate - PZ0021), κολιστίνης (Colistin sulfate salt - C4461), μεροπενέμης (Meropenem trihydrate - M2574), γενταμικίνης (Gentamicin sulfate - G1914) και φωσφομυκίνης (Phosphomycin disodium salt - P5396), οι οποίες αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Σωληνάρια με θρεπτικό ζωμό ενοφθαλμίστηκαν με 10^5 - 10^6 CFU/ml μικροβιακού εναιωρήματος. Προστέθηκαν τα αντιβιοτικά κάθε συνδυασμού κατά μόνας και μαζί, σε συγκεντρώσεις που περιελάμβαναν υπερ- και υπο-ανασταλτικές, με βάση την MIC κάθε μικροοργανισμού, συγκεντρώσεις. Τα σωληνάρια επώαστηκαν στους $35^{\circ}\pm 2$ C και πάρθηκαν δείγματα από αυτά σε επιλεγμένες στιγμές κατά τη διάρκεια της επώασεώς τους (0, 1, 3, 5 και 24 ώρες) ώστε να μετρηθούν οι ζώσες αποικίες του μικροβίου μετά την επίδραση του κάθε ενός από τα αντιβιοτικά καθώς και των συνδυασμών τους. Συγκεκριμένα, λαμβανόταν ποσότητα ίση με 0.1 ml, αραιωνόταν διαδοχικά σε ζωμό Mueller-Hinton II (7 αραιώσεις) και 25 μl από κάθε αραιώση επιστρωνόταν σε τριβλία με άγαρ Mac Conckey τα οποία και επωάζονταν για να μετρηθούν οι αναπτυχθείσες αποικίες.

Σαν *συνέργεια* ορίστηκε η $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml μείωση των ζώντων αποικιών από την επίδραση του συνδυασμού των δύο αντιβιοτικών στις 24 ώρες σε σχέση με τις αποικίες που αναπτύσσονταν παρουσία μόνον του πιο δραστικού από τα δύο. Η μείωση $< 2 \log_{10}$ CFU/ml ορίστηκε ως "αδιαφορία", ενώ η αύξηση κατά $\geq 2 \log_{10}$ CFU/ml ως ανταγωνισμός (Pillai (a)2005, NCCLS 1999). Ως *βακτηριοκτόνος δράση* ενός αντιβιοτικού ή συνδυασμών αντιβιοτικών ορίστηκε η μείωση κατά $\geq 3 \log_{10}$ CFU/ml του αρχικού ενοφθαλμίσματος μετά 24 ώρες επώσεως με το αντιβιοτικό αυτό (Amsterdam 1991).

Ο ρυθμός της μικροβιακής θανάτωσης από μια συγκεκριμένη συγκέντρωση ενός ή συνδυασμού αντιβιοτικών μπορεί να απεικονιστεί με μια καμπύλη θανάτωσης/χρόνου (time kill curve) (Εικόνα 7.3).



Εικόνα 7.3. Κινητική θανάτωσης/χρόνου απουσία αντιβιοτικού (κύκλοι), παρουσία αντιβιοτικού A (κενά τετράγωνα), αντιβιοτικού B (τρίγωνα), και συνδυασμού αντιβιοτικών A και B (μαύρα τετράγωνα). (Tamma et al. 2012).

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών για τα πειράματα επιλέχθηκαν με βάση διαθέσιμα φαρμακοκινητικά δεδομένα. Έτσι, για την τιγκεκυκλίνη χρησιμοποιήθηκαν 1.3 mg/L, συγκέντρωση σύμφωνη με φαρμακοκινητικές μελέτες τιμών στον ορό που επιτυγχάνονται με σχήμα πολλαπλών δόσεων 50mg ανά 12ωρο με αρχική δόση 100mg (Barbour et al. 2009, Giamarellou et al. 2011, Greer et al. 2006) ή μετά χορήγηση μονής δόσης (single dose) 100mg (Karaiskos & Giamarellou 2014). Για τη γενταμικίνη χρησιμοποιήθηκαν 10 mg/L με βάση στοιχεία για τη C_{max} (Kashuba et al. 1999) και 300 mg/L για τη φωσφομυκίνη με βάση ανάλογα στοιχεία για παρεντερική χρήση φωσφομυκίνης (Roussos et al. 2009) και χρήση σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας (Parker et al. 2013). Η συγκέντρωση για την κολιστίνη καθορίστηκε στα 2 mg/L σύμφωνα με στοιχεία επίτευξης μεγίστης δόσης σε σταθερή κατάσταση (steady state C_{max}) σε σοβαρά ασθενείς (Plachouras et al. 2009, Markou

et al. 2008). Για τη μεροπενέμη χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10 και 30 mg/L βασισμένες σε φαρμακοκινητικά στοιχεία σε σοβαρά ασθενείς (Binder et al. 2013) και σε ευρήματα σχετικά με την επίτευξη φαρμακοδυναμικών στόχων με σχήματα υψηλής δόσης παρατεταμένης έγχυσης μεροπενέμης για λοιμώξεις από CRKP με MICs έως 32 mg/L (Cojutti et al. 2017, Del Bono et al. 2017). Οι μεροπενέμη, κολιστίνη, γενταμικίνη και φωσφομυκίνη μελετήθηκαν επίσης σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις (0.5xMIC του κάθε στελέχους), σε περίπτωση που αυτές δεν υπερέβαιναν την επιλεγμένη συγκέντρωση που αναφέρθηκε για κάθε παράγοντα.

7.5.2. Μέθοδος της «σκακιάρας» (Checkerboard-CB)

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Κάθε υποδοχή («πηγαδάκι») περιέχει το πρώτο αντιβιοτικό (φάρμακο Α) του συνδυασμού σε διαδοχικές αραιώσεις κατά μήκος των τεταγμένων και το δεύτερο αντιβιοτικό ομοίως κατά μήκος των τετμημένων (φάρμακο Β) (Εικόνα 7.4).

Εικόνα 7.4. Πλάκα μικροτιτλοδότησης με μορφή σκακιάρας

Αντιβιοτικό Α		16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	16 /	Αντιβιοτικό Β	
		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
16		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
8		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
4		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
2		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
1		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
0,5		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
0,25		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16
0		0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	0	16

Έτσι, η διάταξη στις πλάκες έγινε με την τιγεκυκλίνη σε διαδοχικές αραιώσεις κατά μήκος των τεταγμένων (16mg/L ως 0.25mg/L) και την κολιστίνη ή τη γενταμικίνη ή τη μεροπενέμη κατά μήκος των τετηγμένων (32mg/L ως 0.03mg/L για την κολιστίνη, 256mg/L ως 0.25mg/L για τη γενταμικίνη και 32mg/L ως 0.03mg/L για τη μεροπενέμη). Το βακτηριακό εναιώρημα προσαρμόστηκε σε 5×10^5 cfu/ml και μοιράστηκε στις υποδοχές της πλάκας («πηγαδάκια»). Οι πλάκες στη συνέχεια επωάστηκαν στους $35 \pm 2^\circ\text{C}$ για 24 ώρες.

Η αλληλεπίδραση των αντιβιοτικών εκφράστηκε με τη χρήση του Δείκτη Κλασματικής Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Fractional Inhibitory Concentration Index-FIC Index ή ΣFIC), ο οποίος ορίζεται ως το άθροισμα της κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης του φαρμάκου A (FIC_A) και της κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης του φαρμάκου B (FIC_B), όπου FIC_A είναι η MIC του φαρμάκου A στο συνδυασμό / MIC του φαρμάκου A μόνου του και FIC_B η MIC του φαρμάκου B στο συνδυασμό / MIC του φαρμάκου B μόνου του. Ο συνδυασμός θεωρείται συνεργικός εάν ο FICI είναι ≤ 0.5 , αθροιστικός (additive) εάν είναι >0.5 και ≤ 1 , αδιάφορος εάν βρεθεί μεταξύ 1 και 4 (>1 και ≤ 4) και ανταγωνιστικός εάν είναι >4 . (Pillai (b)2005). (Εικόνα 7.5).

Τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν, ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα.

$$FIC = \left(\frac{MIC_{combination\ A\&B}}{MIC_{agent\ A}} \right) + \left(\frac{MIC_{combination\ A\&B}}{MIC_{agent\ B}} \right)$$

FIC Value	Interpretation
≤ 0.5	Synergy
$>0.5-1$	Additive
1-4	Indifference
>4	Antagonism

Example

Agent	MIC (Alone)	MIC (Combination)
A	16	2
B	8	2

$$FIC = \left(\frac{2}{16} \right) + \left(\frac{2}{8} \right) = 0.375 = \text{Synergy}$$

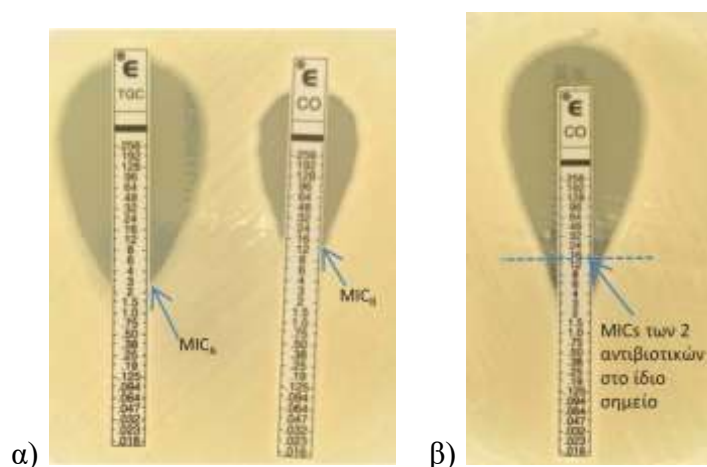
Εικόνα 7.5. Απεικόνιση του υπολογισμού του δείκτη FIC ενός συνδυασμού αντιβιοτικών (Doern 2014).

7.5.3. Μέθοδοι με τη χρήση ταινιών κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικών (Etest).

Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές τεχνικές:

α) Μέθοδος MIC/MIC ratio («του αποτυπώματος»).

Σε αυτήν, αρχικά τοποθετήθηκε ταινία Etest του 1^{ου} αντιβιοτικού του συνδυασμού επί τριβλίου με Mueller Hinton άγαρ ενοφθαλμισμένου με το υπό εξέταση στέλεχος, επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, εν συνεχεία απομακρύνθηκε και επί του αποτυπώματός της τοποθετήθηκε ταινία Etest του 2^{ου} αντιβιοτικού, κατά τρόπον ώστε τα σημεία των MIC των δύο αντιβιοτικών (οι οποίες έχουν ήδη προσδιοριστεί με τη μέθοδο του Etest), να συμπέσουν (Εικόνα 7.6). Μετά ολονύκτια επώαση, προσδιορίστηκαν οι MIC που προέκυψαν για τα δύο αντιβιοτικά μετά το συνδυασμό τους (η ταινία Etest του πρώτου αντιβιοτικού που είχε αρχικώς απομακρυνθεί καθαρίστηκε με αιθανόλη 70% και χρησιμοποιήθηκε ως κλίμακα ανάγνωσης). Για το χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης των αντιβιοτικών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης κλασματικής ανασταλτικής συγκέντρωσης (Fractional Inhibitory Concentration Index-FICI), όπως ορίστηκε ανωτέρω. (Etest Application Sheet EAS 023).

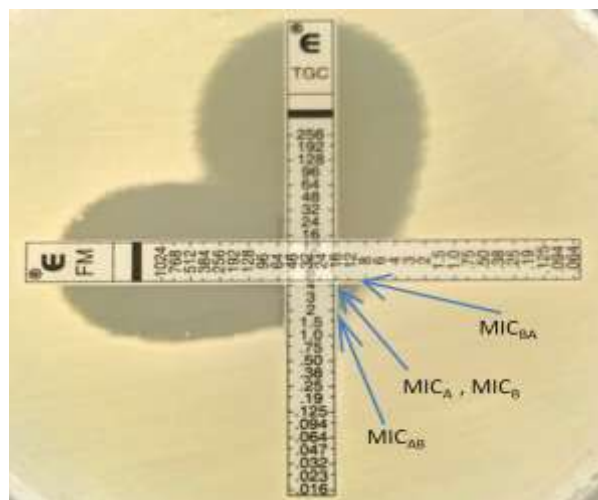


Εικόνα 7.6. Μέθοδος MIC/MIC ratio. α) προσδιορισμός MIC για τα δύο αντιβιοτικά, β) τοποθέτηση ταινίας του ενός αντιβιοτικού επί του αποτυπώματος του άλλου έτσι ώστε να συμπέσουν τα σημεία των προκαθορισμένων MIC.

β) Μέθοδος «σχηματισμού σταυρού» (Cross Formation-CF).

Σε αυτήν, τοποθετήθηκαν ταινίες Etest των δύο αντιβιοτικών του κάθε συνδυασμού, συγχρόνως, κάθετα (σε γωνία 90°) η μία προς την άλλη, κατά τρόπο

τέτοιο ώστε τα σημεία που παριστούν τις - προκαθορισμένες - MIC τους να συμπίπτουν, σε τριβλίο με Mueller Hinton άγαρ ενοφθαλμισμένο με το υπό εξέταση στέλεχος (White et al. 1996). Μετά ολονύκτια επώαση, μετρήθηκαν οι νέες MIC και υπολογίστηκε ο δείκτης FICI για να προσδιοριστεί η αλληλεπίδραση των αντιβιοτικών (Εικόνα 7.7).



Εικόνα 7.7. Μέθοδος σχηματισμού σταυρού. Τοποθέτηση ταινιών καθέτως μεταξύ τους ώστε να «τέμνονται» στα σημεία των MIC των δύο αντιβιοτικών. Οι νέες MIC (MIC_{AB} , MIC_{BA}) θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του δείκτη FICI: $FICI = MIC_{AB} / MIC_A + MIC_{BA} / MIC_B$.

γ) Μέθοδος Άγαρ/Etest.

Τριβλία με άγαρ με ενσωματωμένη τιγκεκυκλίνη σε συγκέντρωση 1.3 mg/l, που είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα με ΚΘΧ, ενοφθαλμίστηκαν με μικροβιακό εναιώρημα θολρότητας 0.5 κλίμακας McFarland και ταινίες Etest του δευτέρου αντιβιοτικού του εκάστοτε συνδυασμού τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια. Για στελέχη με χαμηλές MIC στην τιγκεκυκλίνη (1 και 2 mg/L) χρησιμοποιήθηκε μειωμένη συγκέντρωση τιγκεκυκλίνης (0.65 mg/L). Εάν η MIC του άλλου αντιβιοτικού μειωνόταν κατά ≥ 3 υποδιπλάσιες αραιώσεις, το αποτέλεσμα του συνδυασμού θεωρείτο συνεργικό (Sopirala et al. 2010). Εάν η μείωση ήταν της

τάξεως των 2 αραιώσεων, εθεωρείτο αθροιστικό και αν μικρότερη (κατά μία αραιώση), αδιάφορο (Εικόνα 7.8).



Εικόνα 7.8. Μέθοδος Άγαρ/Etest. Μείωση της MIC της κολιστίνης κατά μία υποδιπλάσια αραιώση (από 16 mg/l σε 8 mg/l) μετά αλληλεπίδραση με τιγκεκυκλίνη ενσωματωμένη στο άγαρ.

7.6. ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΣΥΝΕΡΓΕΙΑΣ

Ως μέθοδος αναφοράς για την αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων ελέγχου συνέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο. Παρότι δεν υπάρχει «gold standard» για το σκοπό αυτό, (Doern 2014) η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές ως μέτρο σύγκρισης για την αξιολόγηση άλλων μεθοδολογιών, όπως αυτές με Etest (White et al. 1996, Bonapace et al. 2010, Sopirala et al. 2010, Pankey et al. 2013, Motos et al. 2019). Επιπλέον, είναι η μόνη μέθοδος εκτίμησης αντιμικροβιακών συνδυασμών που έχει περιγραφεί και εγκριθεί από επίσημο φορέα (NCCLS 1999).

Για να εκτιμηθεί η συμφωνία των άλλων μεθόδων με την ΚΘΧ χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός δείκτης ομοφωνίας **Cohen's kappa (κ)** (Sabin 2000). Ο δείκτης αυτός αποτελεί μέτρο συμφωνίας μεταξύ δύο ομάδων μετρήσεων που αφορούν το ίδιο αντικείμενο. Για να υπολογιστεί, λαμβάνεται υπόψη το ποσό των μετρήσεων που είναι πιθανόν να συμφώνησαν μεταξύ τους κατά τύχη. Τούτο εν συνεχεία αφαιρείται με τρόπο ώστε ο υπολογιζόμενος βαθμός συμφωνίας να αντανακλά την ουσιαστική συμφωνία των μεθόδων που εκτιμώνται. Ως παράδειγμα υπολογισμού του συντελεστή αυτού, παρατίθενται οι μετρήσεις που έγιναν κατά τη μελέτη του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης με τις μεθόδους της ΚΘΧ και της σκακιάρας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσον αφορά τις περιπτώσεις συνεργείας και αδιαφορίας στις οποίες κατέληξε κάθε μέθοδος, φαίνονται στον πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3. Παράδειγμα εφαρμογής συντελεστή κ . Παράθεση μετρήσεων μεθόδων ΚΘΧ και Σκακιάρας για το συνδυασμό τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης προς υπολογισμό συντελεστή κ

		Αποτελέσματα ΚΘΧ		
		Συνέργεια	Αδιαφορία	Σύνολο
Αποτελέσματα σκακιάρας	Συνέργεια	1	4	5
	Αδιαφορία	2	4	6
	Σύνολο	3	8	11
Αριθμός στελεχών όπου βρέθηκε συμφωνία		1	4	5
Αριθμός στελεχών όπου βρέθηκε συμφωνία από τύχη		1,36	4,36	5,72
Cohen's Kappa		-0,14		

Σύμφωνα με τον πίνακα, η ΚΘΧ βρήκε συνέργεια σε 3 από τα 11 στελέχη, δηλαδή σε ποσοστό 27.27%. Αντίστοιχα, η μέθοδος της σκακιέρας βρήκε συνέργεια σε 5 από 11 στελέχη, δηλαδή σε ποσοστό 45.45%. Έτσι ένα ποσοστό $27.27\% \times 45.45\% = 12.39\%$ των περιπτώσεων συνεργείας είναι αποτέλεσμα τύχης. Αυτό σημαίνει, για τα 11 στελέχη, ότι σε $12.39\% \times 11 = 1.36$ από αυτά βρέθηκε συνέργεια από τύχη. Όσον αφορά το αποτέλεσμα της αδιαφορίας, αντιστοίχως βρίσκεται πως σε 4.36 από τα στελέχη βρέθηκε αδιαφορία και από τις δύο μεθόδους και πάλι από τύχη. Συνολικά, στα $1.36 + 4.36 = 5.72$ στελέχη από τα 11 είχαμε συμφωνία των δύο μεθόδων από τύχη, με τελικό αποτέλεσμα είτε συνέργεια είτε αδιαφορία. Ο συντελεστής Cohen's kappa (κ) θα υπολογιστεί τώρα ως εξής: Cohen's Kappa=

$$\frac{\text{αριθμός στελεχών όπου βρέθηκε συμφωνία} - \text{αριθμός στελεχών όπου βρέθηκε συμφωνία από τύχη}}{\text{σύνολο στελεχών} - \text{αριθμός στελεχών όπου βρέθηκε συμφωνία από τύχη}}$$

$$\frac{5 - 5,72}{11 - 5,72} = -0.14.$$

Κατά τον τρόπο αυτό, υπολογίστηκε ο συντελεστής κ ως μέτρο συμφωνίας μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ελέγχου συνέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη και της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο, όπως επίσης και μεταξύ των μεθόδων Etest με τη μέθοδο της Σκακιέρας.

Η ερμηνεία των υπολογισθέντων τιμών του συντελεστή κ έγινε με βάση τον ορισμό: η συμφωνία μεταξύ των μεθόδων που προκύπτει είναι *πτωχή* εάν $\kappa \leq 0.20$, *«κάποια»* αν $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$, *μέτρια* αν $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$, *σημαντική* αν $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ και *καλή* αν $\kappa > 0.80$ (Sabin 2000). Στο παράδειγμα που παρατέθηκε ανωτέρω, όπου βρέθηκε $\kappa = -0.14$, η συμφωνία των μεθόδων ΚΘΧ και σκακιέρας για το συνδυασμό τιγεκυκλίνης/κολιστίνης χαρακτηρίζεται ως «πτωχή».

Κεφάλαιο 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 Έλεγχος ευαισθησιών και φαινοτυπικός έλεγχος στελεχών

Μελετήθηκαν 26 πολυανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν διαφόρων τύπων καρβαπενεμάσες. Όλα τα στελέχη ήσαν μη ευαίσθητα στη μεροπενέμη με MICs που κυμάνθηκαν από 4 ως 32 mg/L. Οι ευαισθησίες των στελεχών ερμηνεύθηκαν με τα κριτήρια της EUCAST (EUCAST a) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1. Ευαισθησίες στελεχών μελέτης

Αντιβιοτικό	Εύρος MIC (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Ευαισθησία (%)
Αμπικιλίνη/Σουλμπακτάμη	≥32	≥32	≥32	0.0%
Πιπερασιλλίνη/Ταζομπακτάμη	≥128	≥128	≥128	0.0%
Κεφοξιτίνη ^a	16-≥64	≥64	≥64	0.0%
Κεφταζιδίμη	32-≥64	≥64	≥64	0.0%
Κεφτριαζόνη	16-≥64	≥64	≥64	0.0%
Κεφεπίμη	1-≥64	≥64	≥64	0.0%
Αζτρεονάμη	≤1-≥64	≥64	≥64	3.8%
Ιμιπενέμη	8-≥16	≥16	≥16	0,0%
Μεροπενέμη ^b	4-≥16	≥16	≥16	0.0%
Αμικασίνη	≤2-≥64	≥64	≥64	7.7%
Γενταμικίνη ^b	0.5-≥16	4	≥16	42.3%
Σιπροφλοξασίνη	1-≥4	≥4	≥4	0.0%
Λεβοφλοξασίνη	≥8	≥8	≥8	0.0%
Τιγκεκυκλίνη ^b	1-≥32	4	8	3.8%
Φωσφομυκίνη ^c	16-128	32	64	65.4%
Κολιστίνη ^b	0.5-≥64	2	32	53.8%
Κοτριμοξαζόλη ^d	≤1-≥16	≥16	≥16	23.1%

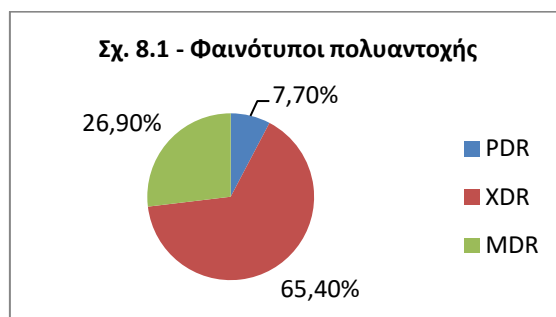
^a Χρησιμοποιήθηκε η τιμή ECOFF (8mg/L) για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας

^b Ελέγχθηκαν με τη μέθοδο αναφοράς μικροαραιώσεων σε ζυμό

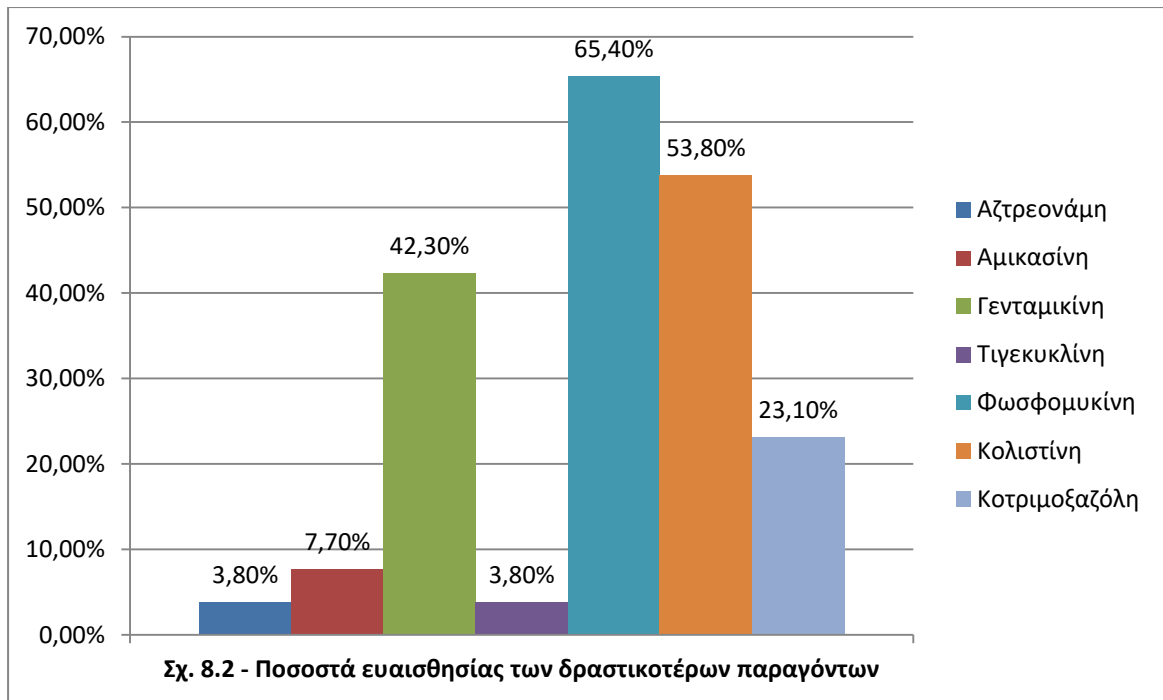
^c Ελέγχθηκαν με Etest, καθώς η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζυμό δεν είναι αξιόπιστη για τη φωσφομυκίνη

^d Τριμεθοπρίμη:σουλφομεθοξαζόλη σε αναλογία 1:19. Οι MIC εκφράζονται ως συγκεντρώσεις τριμεθοπρίμης.

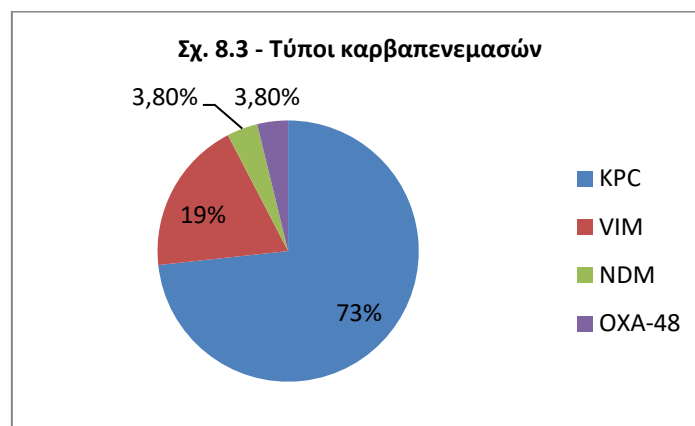
Υπήρχαν 2 (7.7%) στελέχη με φαινότυπο PDR (pandrug-resistant), 17 (65.4%) με φαινότυπο XDR (extensively drug-resistant) και 7 (26.9%) με φαινότυπο MDR (multidrug-resistant), σύμφωνα με τους ορισμούς του ECDC (Magiorakos et al. 2012) (Σχήμα 8.1).



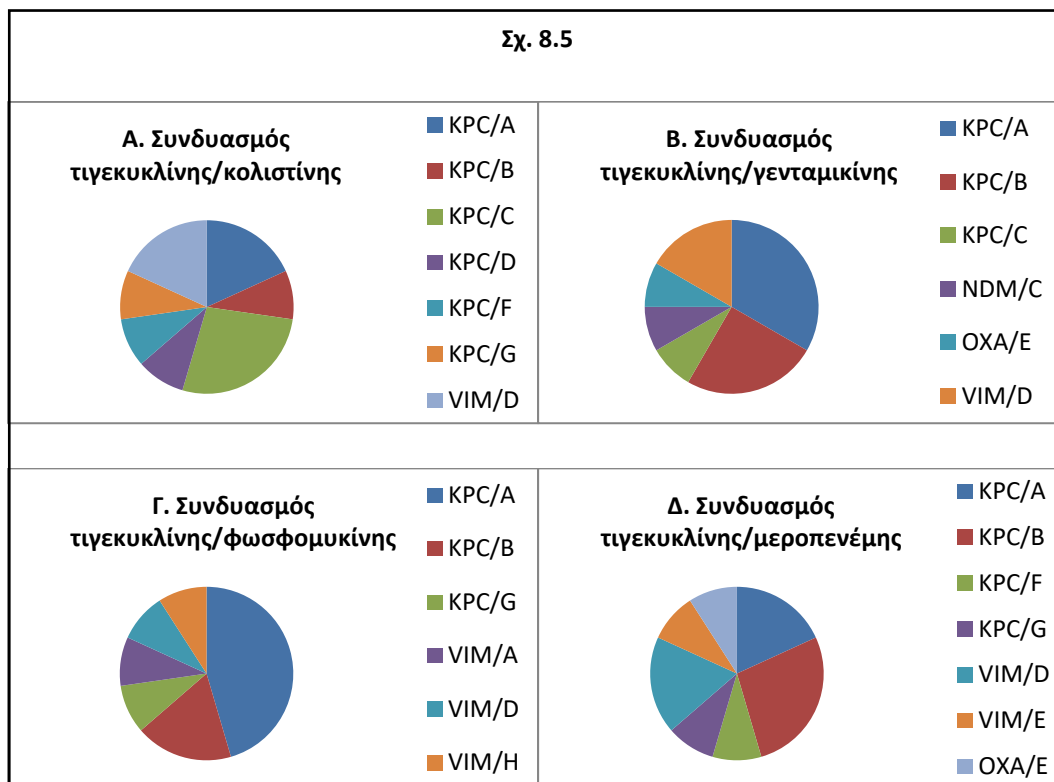
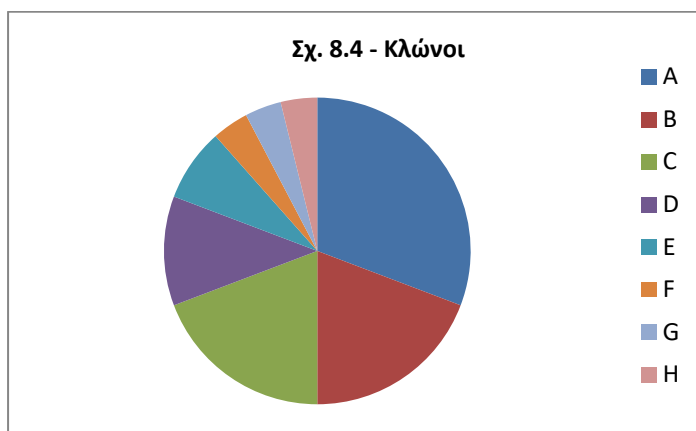
Τα στελέχη ήταν ανθεκτικά όχι μόνο στις καρβαπενέμες αλλά και σε όλες τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1^{ης} έως 3^{ης} γενεάς, κεφαμυκίνες, συνδυασμούς β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμασών και φθοριοκινολόνες. Η αζτρεονάμη ήταν δραστική έναντι ενός στελέχους το οποίο παρήγαγε καρβαπενεμάση τύπου NDM. Η τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη βρέθηκε δραστική έναντι έξι στελεχών (23%). Η κολιστίνη και η φωσφομυκίνη ήταν τα πιο δραστικά αντιβιοτικά, με το 53.8% και 65.4% των στελεχών να εμφανίζει ευαισθησία σε αυτά. Η γενταμικίνη ήταν δραστική στο 42.3% των στελεχών. Τέλος, η τιγκεκυκλίνη, που αποτελεί και το κεντρικό αντιβιοτικό των συνδυασμών που μελετήθηκαν, ήταν δραστική μόνο έναντι ενός στελέχους (3.8%) (Σχήμα 8.2).



Ο συνηθέστερος τύπος παραγόμενης καρβαπενεμάσης ήταν ο τύπος KPC (19 στελέχη, ποσοστό 73%), ακολουθούμενος από τον τύπο VIM (5 στελέχη, ποσοστό 19%). Υπήρχε ακόμη ένα στέλεχος που παρήγαγε καρβαπενεμάση τύπου NDM και ένα τύπου OXA-48 (Σχήμα 8.3).



Η επιδημιολογική τυποποίηση έδειξε ότι τα στελέχη της μελέτης ανήκαν σε 8 διαφορετικούς κλώνους, A-H (Σχήμα 8.4). Τα στελέχη που παρήγαγαν καρβαπενεμάση τύπου KPC (n=19) ανήκαν σε 6 διαφορετικούς κλώνους και τα στελέχη που παρήγαγαν VIM (n=5) σε 4. Στη μελέτη των συνδυασμών τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης και τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης χρησιμοποιήθηκαν στελέχη που ανήκαν σε 7 διαφορετικούς συνδυασμούς κλώνου/καρβαπενεμάσης. Για τη μελέτη των συνδυασμών τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης και τιγκεκυκλίνης/φωσομυκίνης τα στελέχη ανήκαν σε 6 διαφορετικούς τέτοιους τύπους. Η ποικιλότητα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται στο Σχήμα 8.5.



8.2 Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης

Χρησιμοποιήθηκαν 11 στελέχη τα οποία μελετήθηκαν με:

A) τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Time Kill Assay). Έγιναν πειράματα με συγκέντρωση κολιστίνης 2mg/L καθώς και συγκέντρωση ίση με 0.5 x MIC του στελέχους, εφ'όσον η τιμή αυτή δεν υπερέβαινε (ή ήταν ίση με) τα 2mg/L. Η συγκέντρωση της τιγκεκυκλίνης διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα (1.3mg/L).

B) τη μέθοδο της «σκακιέρας» (Checkerboard method-CB)

Γ) τις τρεις μεθόδους των Etest που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο «Υλικά –Μέθοδοι»: τη μέθοδο MIC/MIC ratio («του αποτυπώματος»), αυτή του «σχηματισμού σταυρού» (Cross Formation-CF method) και τη μέθοδο Άγαρ/Etest.

Τα πειράματα περιέλαβαν 5 ευαίσθητα (εύρος MIC: 1-2mg/l) και 6 ανθεκτικά (εύρος MIC: 4->32mg/l) στην κολιστίνη στελέχη. Τα στελέχη ήσαν όλα μη ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη πλην ενός (εύρος MIC: 1-8mg/l).

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.2. Σε αυτόν, τα αποτελέσματα των μεθόδων της σκακιέρας, της μεθόδου αποτυπώματος Etest και του σχηματισμού σταυρού Etest εκφράζονται με το δείκτη FICI και συνεργική αλληλεπίδραση προκύπτει, όπως έχει προειπωθεί, εάν τούτος βρεθεί ≤ 0.5 . Για τη μέθοδο άγαρ/ Etest αναγράφεται η μορφή της αλληλεπίδρασης που παρατηρείται και για την ΚΘΧ αναγράφεται η διαφορά σε \log_{10} CFU/mL του μικροβιακού πληθυσμού μετά την επίδραση του συνδυασμού και αυτού που μένει μετά την επίδραση του πιο δραστικού αντιβιοτικού, όπως και η τελική μορφή της αλληλεπίδρασης που παρατηρείται. Σημειώνεται ότι μια μείωση με τιμή $\Delta \log_{10}$ CFU/mL μεταξύ του συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού ≥ 2 , αξιολογείται ως συνέργεια μόνον όταν ο μικροβιακός πληθυσμός που επεβίωσε μετά την επίδραση του συνδυασμού είναι κατά $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL μειωμένος σε σχέση με το αρχικό ενοφθάλμισμα.

Πίνακας 8.2. Αποτελέσματα ελέγχου συνέργειας συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης										
Α/α	Στελέχος	Τύπος/ Κλώνος	MIC (mg/L)		CB	Μέθοδοι Etest : FICI ή μορφή αλληλεπίδρασης			ΚΘΧ: Δlog ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού/ μορφή αλληλεπίδρασης	
			TIG	COL		FICI	MIC/MIC	CROSS-F	AGAR	TIG(1.3mg/L) COL (0.5xMIC)
1	372 PAP	KPC/F	2	1	0.63	2	2	ΑΔ	-8,4/ΣΥΝ	-6,3/ΑΔ*
2	462	VIM/D	8	1	0.63	0.4	2	ΑΔ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
3	274	KPC/A	8	1	1	0.3	2	ΑΔ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
4	395	VIM/D	8	1	1	0.4	2	ΑΔ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
5	100309595	KPC/C	2	2	0.52	1	1	ΑΘΡ	-5,1/ΣΥΝ	-5,1/ΣΥΝ
6	418	KPC/G	4	4	0.75	0.3	1.1	ΣΥΝ	ΔΕ	-3,7/ΑΔ*
7	100185535	KPC/D	8	16	0.25	0.4	0.7	ΣΥΝ	ΔΕ	-2,9/ΑΔ*
8	399 PAG	KPC/B	2	32	0.28	1.16	0.91	ΣΥΝ	ΔΕ	-7,1/ΣΥΝ
9	100271992	KPC/C	1	32	0.5	1	1	ΣΥΝ	ΔΕ	-1,3/ΑΔ
10	100183978	KPC/C	4	>32	0.31	0.4	0.75	ΣΥΝ	ΔΕ	-3,7/ΑΔ*
11	261	KPC/A	8	>32	0.16	0.2	1.25	ΣΥΝ	ΔΕ	-0,6/ΑΔ
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)					5/11 (45%)	7/11 (64%)	0/11 (0%)	6/11 (55%)	3/11 (27%)	
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)					6/11 (55%)	2/11 (18%)	5/11 (45%)	1/11 (9%)		

TIG:τιγκεκυκλίνη, COL:κολιστίνη, CB: μέθοδος σκακιέρας (checkerboard), MIC/MIC: μέθοδος Etest MIC/MIC ratio («αποτυπώματος»), CROSS-F: μέθοδος Etest σχηματισμού σταυρού (cross formation), AGAR: μέθοδος άγαρ/Etest, ΑΔ:αδιαφορία, ΑΘΡ: αθροιστική δράση, ΣΥΝ: συνέργεια.

Οι συνεργικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με έντονους χαρακτήρες και γραμμοσκιασμένες.

* Συνέργεια που δεν αξιολογείται, καθώς ο μικροβιακός πληθυσμός που επεβίωσε μετά την επίδραση του συνδυασμού δεν βρέθηκε κατά $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL μειωμένος σε σχέση με το αρχικό ενοφθάλμισμα.

ΔΕ: δεν έγινε (δεν εφαρμόζεται καθώς συγκέντρωση κολιστίνης 0.5xMIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι ίση ή μεγαλύτερη από τη θεωρούμενη ως επιτεύξιμη στον ορό συγκέντρωση των 2mg/L).

Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης / κολιστίνης με τη μέθοδο της ΚΘΧ έδειξε συνέργεια έναντι **τριών από τα 11 (27%)** στελέχη (Διάγραμμα 1). Δύο από αυτά ήταν ευαίσθητα και ένα ανθεκτικό στην κολιστίνη, ενώ και τα τρία ήταν μη ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη.

Με τη μέθοδο της σκακιέρας, ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-κολιστίνης ήταν είτε συνεργικός είτε αθροιστικός (45% και 55% αντίστοιχα), ενώ δεν υπήρχαν αδιάφορα αποτελέσματα. Μεταξύ των μεθόδων με Etest, αυτή του «αποτυπώματος» (MIC/MIC ratio method) έδωσε τα περισσότερα συνεργικά αποτελέσματα (64%), ακολουθούμενη από τη μέθοδο «άγαρ/Etest» (55%). Η μέθοδος του σχηματισμού

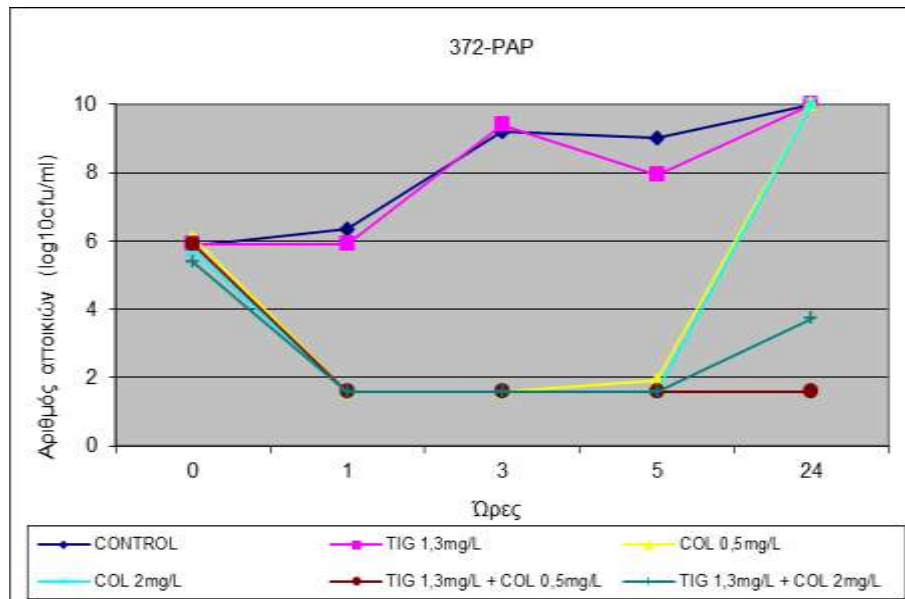
σταυρού δεν έδωσε κανένα συνεργικό αποτέλεσμα, αλλά έδειξε μόνον αθροιστική δράση στο 45% των στελεχών.

Συνεργική αλληλεπίδραση μεταξύ κολιστίνης και τιγεκυκλίνης παρατηρήθηκε με τη μέθοδο της ΚΘΧ σποραδικά και σε άλλες χρονικές στιγμές πλην των 24 ωρών (Πίνακας 8.3).

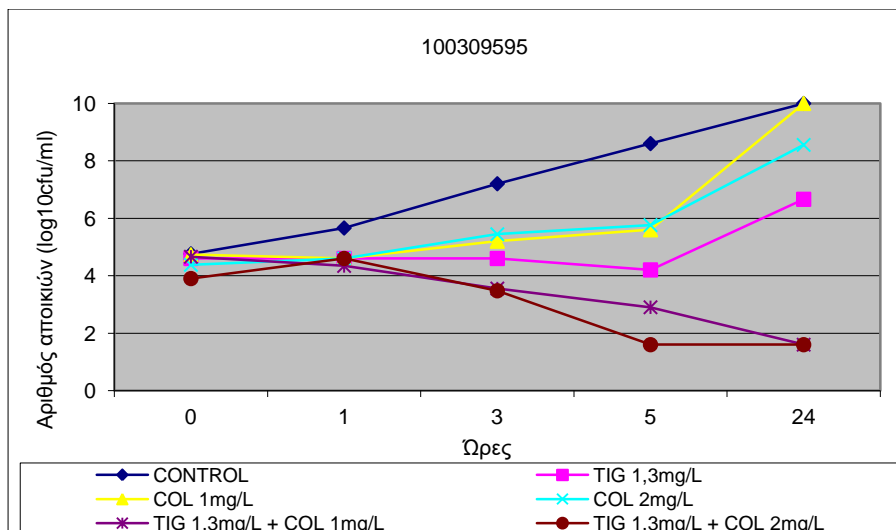
Πίνακας 8.3. Συνέργεια συνδυασμού τιγεκυκλίνης/κολιστίνης σε διάφορες ώρες									
Α/α	Στέλεχος	ΚΘΧ: Δlog ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού με αποτέλεσμα συνέργεια							
		TIG(1.3mg/L) COL (0.5xMIC)				TIG(1.3mg/L) COL (2mg/L)			
		ΩΡΕΣ				ΩΡΕΣ			
		1	3	5	24	1	3	5	24
1	372 PAP	-	-	-	-8.4	-	-	-	-
2	462	-2.0	-	-	-	-	-	-	-
3	274	-	-	-	-	-	-	-	-
4	395	-	-	-	-	-	-	-	-
5	100309595	-	-	-	-5.1	-	-	-2.6	-5.1
6	418	ΔΕ				-	-	-	-
7	100185535	ΔΕ				-	-	-	-
8	399 PAG	ΔΕ				-	-2.5	-5.9	-7.1
9	100271992	ΔΕ				-	-	-	-
10	100183978	ΔΕ				-	-	-	-
11	261	ΔΕ				-	-	-	-

Τιμή Δlog₁₀ ≥-2.0 είναι δηλωτική συνεργείας. Οι τιμές που δηλώνουν συνέργεια στις 24 ώρες σημειώνονται με κόκκινο χρώμα, καθώς οι επίσημοι ορισμοί καθορίζουν τις 24 ώρες ως σημείο εκτίμησης της αλληλεπιδράσεως.

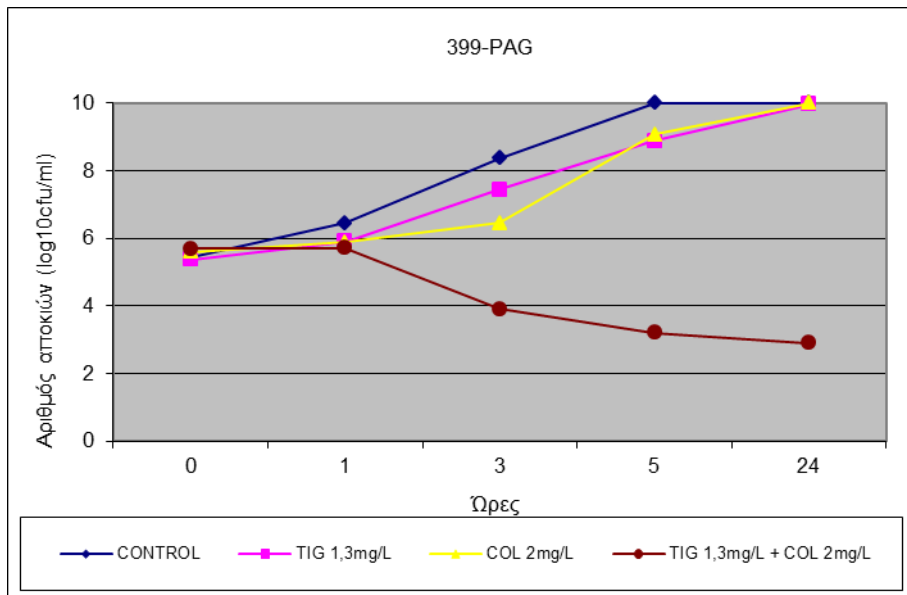
Διάγραμμα 1. Καμπύλες θανάτωσης στελεχών που έδειξαν συνέργεια σε συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης / κολιστίνης.



Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους 372-PAP όπου φαίνεται συνέργεια στις 24h του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης 1.3 mg/L με κολιστίνη 0.5 mg/L , όχι όμως και με κολιστίνη 2 mg/L (αδιαφορία).



Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους 100309595 όπου φαίνεται συνέργεια στις 24h του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης 1.3 mg/L με κολιστίνη 1 mg/L , όπως και με κολιστίνη 2 mg/L.



Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους 399-PAG όπου φαίνεται συνέργεια στις 24h του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης 1.3 mg/L με κολιστίνη 2 mg/L.

8.2.1. Αποτελέσματα προσδιορισμού MIC κολιστίνης με Etest και χρήση τους στη μελέτη των συνδυασμών κολιστίνης

Οι τιμές MIC που καθορίστηκαν με τις μεθόδους BMD και Etest καθώς και η συμφωνία μεταξύ τους φαίνονται στον Πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4. Συμφωνία μεθόδων προσδιορισμού MIC στην κολιστίνη

Στέλεχος	Καρβαπενεμάση/Κλώνος	MIC (mg/L)		Συμφωνία μεθόδων	
		BMD	Etest		
372 PAP	KPC/F	1	0.25	CA	
462	VIM/D	1	1	CA	EA
274	KPC/A	1	2	CA	EA
395	VIM/D	1	2	CA	EA
100309595	KPC/C	2	0.25	CA	
418	KPC/G	4	16	CA	
100185535	KPC/D	16	32	CA	EA
399 PAG	KPC/B	32	4	CA	
100271992	KPC/C	32	32	CA	EA
100183978	KPC/C	>32	32	CA	EA
261	KPC/A	>32	8	CA	
				CA: 11/11 (100%)	
				EA: 6/11 (54.5%)	

BMD: Μικρομέθοδος αραιώσης σε ζυμό

CA: Κατηγορική συμφωνία (categorical agreement)

EA: Βασική συμφωνία (essential agreement)

Από τα ανωτέρω προκύπτει ουσιαστική συμφωνία (Essential Agreement, EA) σε ποσοστό 54.5%, ενώ συμφωνία σε επίπεδο κατηγορίας ευαισθησίας (Categorical Agreement, CA) σε ποσοστό 100%, ώστε δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά ή πολύ σημαντικά λάθη (major και very major errors). Εν γένει παρατηρήθηκε τάση υποτίμησης της MIC από το Etest. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με τη δημοσιευμένη βιβλιογραφία, όπου αναφέρονται μέτρια ποσοστά Essential Agreement, από 43% έως

71% για gram-αρνητικά βακτήρια, μεταξύ ταινιών κλιμακωτής διάχυσης αντιβιοτικού και μεθόδου αναφοράς (Broth Microdilution Method) (Matuschek et al. 2018). Σε αυτήν αναφέρεται επίσης και σημαντική διακύμανση της Categorical Agreement, από 76% ως 85%, κάτι που ωστόσο δε συνέβη στην παρούσα μελέτη, όπου υπήρξε CA 100%. Τα ζητήματα που αφορούν την εγκυρότητα των προσδιορισμών της MIC της κολιστίνης ενδεχομένως συνεπάγονται παρόμοια ζητήματα στον έλεγχο της συνέργειας.

8.3 Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης

Χρησιμοποιήθηκαν 12 στελέχη τα οποία μελετήθηκαν με:

A) τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Time Kill Assay). Έγιναν πειράματα με συγκέντρωση γενταμικίνης 10mg/L καθώς και συγκέντρωση ίση με 0.5xMIC του στελέχους, εφ'όσον η τιμή αυτή δεν υπερέβαινε τα 10mg/L. Η συγκέντρωση της τιγκεκυκλίνης διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα (1.3mg/L).

B) τη μέθοδο της «σκακιέρας» (Checkerboard method-CB)

Γ) τις τρεις μεθόδους των Etest που αναφέρθηκαν ανωτέρω.

Τα πειράματα περιέλαβαν 7 ευαίσθητα (εύρος MIC: 0.5-2mg/l) και 5 ανθεκτικά (εύρος MIC: 4->256mg/l) στην γενταμικίνη στελέχη. Τα στελέχη ήσαν όλα μη ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη (εύρος MIC: 2->16mg/l).

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.5.

Πίνακας 8.5. Αποτελέσματα ελέγχου συνέργειας συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης										
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/κλώβος	MIC (mg/L)		CB	Μέθοδοι Etest : FICI ή μορφή αλληλεπίδρασης			ΚΘΧ: Δlog ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού/ μορφή αλληλεπίδρασης	
			TIG	GN		FICI	MIC/MIC	CROSS-F	AGAR	TIG(1.3mg/L) GN (0.5xMIC)
1	274	KPC/A	8	0.5	0.75	0.6	1.5	ΑΔ	-0.8/ΑΔ	0/ΑΔ
2	257	KPC/B	8	1	0.75	1.2	1.3	ΑΔ	0.7/ΑΔ	0/ΑΔ
3	100309422	KPC/C	8	1	0.75	1.5	2	ΑΔ	0.4/ΑΔ	0/ΑΔ
4	292 ΑΤΤ	ΟΧΑ/Ε	8	1	0.75	2	2	ΑΔ	1.5/ΑΔ	0/ΑΔ
5	937	KPC/A	2	2	0.75	1.5	2	ΑΔ	-8.4/ΣΥΝ	0/ΑΔ
6	345	NDMC	16	2	0.5	0.9	2	ΑΔ	-8.3/ΣΥΝ	0/ΑΔ
7	206 ΚΑΤ	KPC/B	>16	2	1	1.41	1.41	ΑΔ	0.5/ΑΔ	0/ΑΔ
8	382	KPC/B	4	4	0.56	0.7	1	ΑΔ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
9	287	KPC/A	4	128	0.75	0.7	1.5	ΑΔ	ΔΕ	1.1/ΑΔ
10	395	VIM/D	8	128	0.51	1	2	ΑΔ	ΔΕ	-0.3/ΑΔ
11	462	VIM/D	8	256	0.5	0.3	2	ΑΔ	ΔΕ	0/ΑΔ
12	261	KPC/A	8	>256	1	2	2	ΑΔ	ΔΕ	0/ΑΔ
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)					2/12 (17%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	2/12(17%)	
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)					10/12 (83%)	5/12 (42%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)		

TIG:τιγκεκυκλίνη, GN: γενταμικίνη.

ΔΕ: δεν έγινε (δεν εφαρμόζεται καθώς συγκέντρωση γενταμικίνης 0.5xMIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι μεγαλύτερη από τη θεωρούμενη ως επιτεύξιμη στον ορό συγκέντρωση των 10mg/L).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναγράφονται όπως και ανωτέρω.

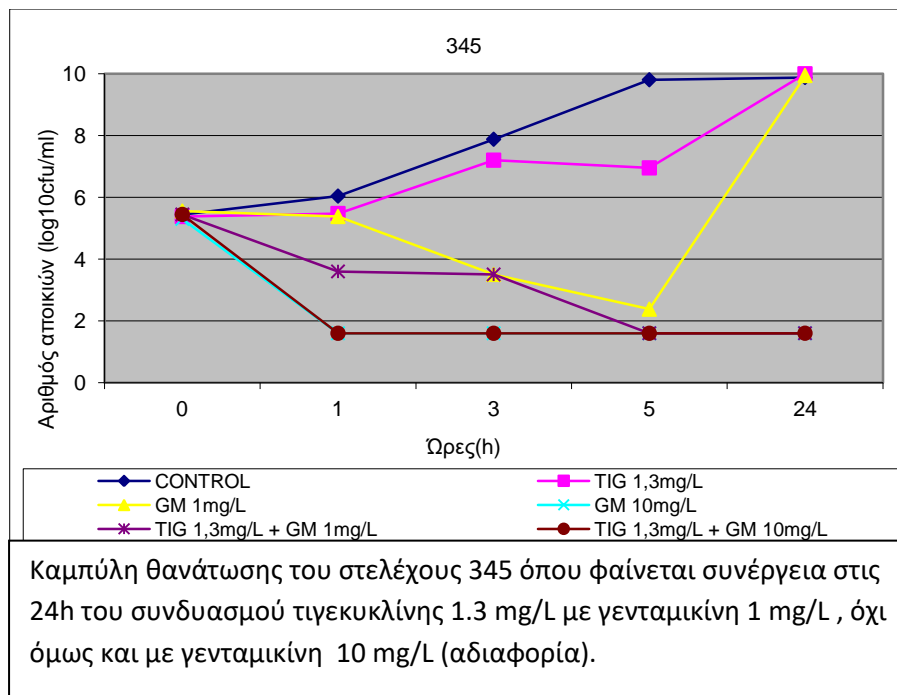
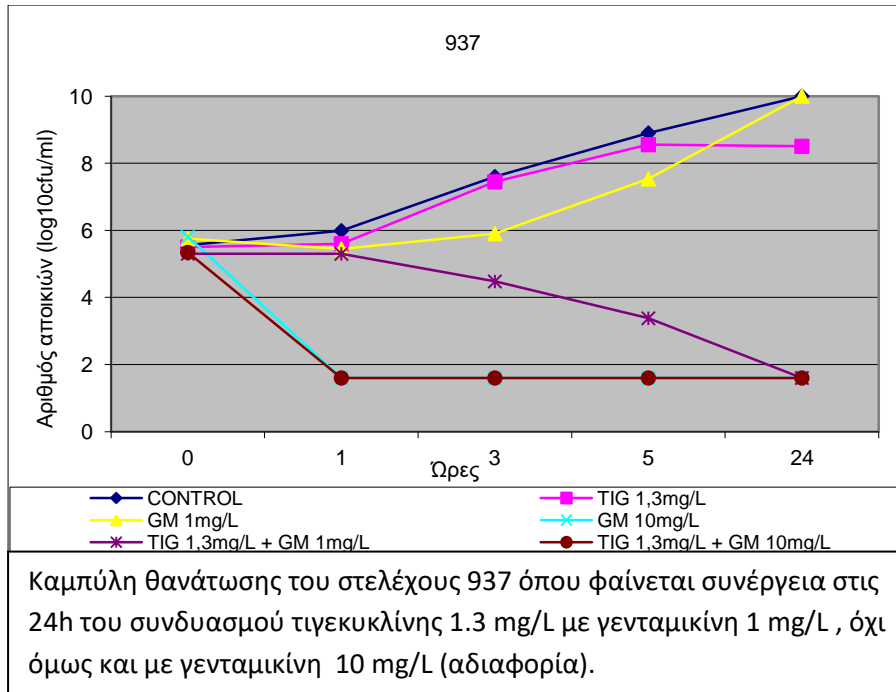
Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης /γενταμικίνης με τη μέθοδο της ΚΘΧ έδειξε συνέργεια έναντι δύο από τα 12 στελέχη (17%) (Διάγραμμα 2). Και τα δύο στελέχη ήσαν ευαίσθητα στη γενταμικίνη. Κανένα από τα ανθεκτικά στη γενταμικίνη στελέχη δεν επέδειξε συνέργεια με τη μέθοδο αυτή.

Με τη μέθοδο της σκακιάρας, ένα ευαίσθητο και ένα ανθεκτικό στη γενταμικίνη στέλεχος επέδειξαν συνέργεια. Σε όλα τα υπόλοιπα στελέχη εκδηλώθηκε αθροιστική δράση (83%). Από τις μεθόδους των Etest, μόνον η μία, αυτή του αποτυπώματος, έδειξε συνέργεια, και μόνον σε ένα στέλεχος, το οποίο έδειξε συνέργεια και με τη μέθοδο της σκακιάρας, αλλ'όχι και με την ΚΘΧ. Οι άλλες δύο μέθοδοι Etest δεν έδειξαν κανένα συνεργικό αποτέλεσμα. Η μέθοδος του αποτυπώματος έδωσε επίσης και το ψηλότερο ποσοστό αθροιστικής δράσης (42%) εν σχέσει με τις άλλες μεθοδολογίες Etest, που έδωσαν κατά βάση αδιάφορα αποτελέσματα.

Τέλος, σπανιότερη ακόμη ήταν η διαπίστωση συνέργειας μεταξύ τιγκεκυκλίνης /γενταμικίνης σε άλλες χρονικές στιγμές πλην των 24 ωρών (Πίνακας 8.6).

Πίνακας 8.6. Συνέργεια συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης σε διάφορες ώρες									
Α/α	Στέλεχος	ΚΘΧ: Δlog ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού με αποτέλεσμα συνέργεια							
		TIG(1.3mg/L)GN (0.5xMIC)				TIG(1.3mg/L)GN (10mg/L)			
		ΩΡΕΣ				ΩΡΕΣ			
		1	3	5	24	1	3	5	24
1	274	-	-	-	-	-	-	-	-
2	257	-	-	-	-	-	-	-	-
3	100309422	-	-	-	-	-	-	-	-
4	292 ΑΤΤ	-	-	-	-	-	-	-	-
5	937	-	-	-4.2	-8.4	-	-	-	-
6	345	-	-	-	-8.3	-	-	-	-
7	206 ΚΑΤ	-	-	-	-	-	-	-	-
8	382	-	-	-	-	-	-	-	-
9	287	ΔΕ				-	-	-	-
10	395	ΔΕ				-	-	-	-
11	462	ΔΕ				-	-	-	-

Διάγραμμα 2. Καμπύλες θανάτωσης στελεχών που έδειξαν συνέργεια σε συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης / γενταμικίνης.



8.4 Μελέτη συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης

Χρησιμοποιήθηκαν 11 στελέχη τα οποία μελετήθηκαν με:

A) τη μέθοδο της ΚΘΧ. Έγιναν πειράματα με συγκέντρωση φωσφομυκίνης 300mg/L καθώς και συγκέντρωση ίση με 0.5 x MIC του κάθε στελέχους. Η συγκέντρωση της τιγκεκυκλίνης διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα (1.3mg/L).

B) τις τρεις μεθόδους των Etest που αναφέρθηκαν ανωτέρω.

Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-φωσφομυκίνης δεν ελέγχθηκε με τη μέθοδο της σκακιάρας, καθώς η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό τιμών MIC φωσφομυκίνης.

Τα πειράματα περιέλαβαν 10 ευαίσθητα (εύρος MIC: 16-32mg/l) και 1 ανθεκτικό (MIC: 64 mg/l) στη φωσφομυκίνη στελέχη. Τα στελέχη ήσαν όλα ανθεκτικά στην τιγκεκυκλίνη (εύρος MIC: 4-8mg/l).

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.7.

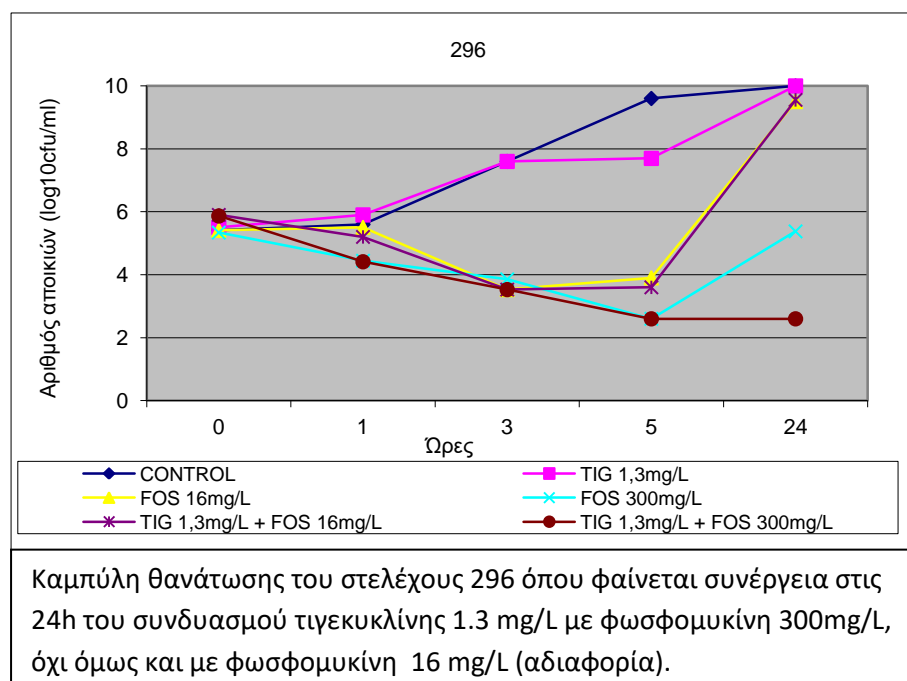
Πίνακας 8.7. Αποτελέσματα ελέγχου συνέργειας συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης									
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/ Κλώ νος	MIC (μg/ml)		Μέθοδοι Etest : FICI ή μορφή αλληλεπίδρασης			ΚΘΧ: Δlog ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού/ μορφή αλληλεπίδρασης	
			TIG	FOS	MIC/MIC	CROSS-F	AGAR	TIG(1.3mg/L) FOS (0.5xMIC)	TIG(1.3mg/L) FOS (300mg/L)
1	418	KPC/G	4	32	1	1.5	ΣΥΝ	-1.1/ΑΔ	-1.1/ΑΔ
2	382	KPC/B	4	32	1.4	1.2	ΑΔ	0/ΑΔ	0.2/ΑΔ
3	211	VIM/H	4	64	0.35	1.4	ΣΥΝ	-0.7/ΑΔ	0.2/ΑΔ
4	334	VIM/A	4	32	0.4	0.6	ΣΥΝ	-1.5/ΑΔ	0/ΑΔ
5	296	KPC/A	4	32	0.25	0.4	ΣΥΝ	0.1/ΑΔ	-2.8/ΣΥΝ
6	257	KPC/B	8	16	0.1	1.4	ΑΘΡ	-0.1/ΑΔ	-0.1/ΑΔ
7	462	VIM/D	8	32	0.25	2	ΣΥΝ	-1.3/ΑΔ	0/ΑΔ
8	274	KPC/A	8	16	0.8	2	ΣΥΝ	-0.5/ΑΔ	-0/ΑΔ
9	261	KPC/A	8	32	0.9	1.25	ΣΥΝ	-0.3/ΑΔ	0/ΑΔ
10	287	KPC/A	4	32	0.75	2	ΣΥΝ	-0.2/ΑΔ	0/ΑΔ
11	391	KPC/A	4	32	0.4	1.4	ΣΥΝ	-0.6/ΑΔ	-0.5/ΑΔ
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)					6/11(55%)	1/11(9%)	9/11(82%)	1/11(9%)	
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)					4/11(36%)	1/11(9%)	1/11(9%)		

TIG:τιγκεκυκλίνη, FOS:φωσφομυκίνη

Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης / φωσφομυκίνης με τη μέθοδο της ΚΘΧ έδειξε συνέργεια έναντι ενός μόνο στελέχους (9%), με MIC στη φωσφομυκίνη 32mg/l, και αδιαφορία έναντι όλων των άλλων στελεχών (Διάγραμμα 3). Αντίθετα, οι μέθοδοι Etest του αποτυπώματος (MIC/MIC ratio method) και «άγαρ/ Etest» έδωσαν υψηλά ποσοστά συνέργειας (55% και 82% αντίστοιχα). Μόνον η μέθοδος του σχηματισμού σταυρού έδωσε αντίστοιχα αποτελέσματα με την ΚΘΧ, αποκαλύπτοντας συνέργεια στο ίδιο στέλεχος που έδειξε συνέργεια με αυτήν.

Δεν διαπιστώθηκε συνέργεια σε στιγμές άλλες πλην των 24 ωρών.

Διάγραμμα 3. Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους που έδειξε συνέργεια σε συνδυασμό τιγκεκυκλίνης / φωσφομυκίνης.



8.5 Μελέτη συνδυασμού τιγεκυκλίνης/μεροπενέμης

Χρησιμοποιήθηκαν 11 στελέχη τα οποία μελετήθηκαν με:

A) τη μέθοδο της ΚΟΧ. Έγιναν πειράματα με συγκέντρωση μεροπενέμης 10 mg/L και 30 mg/L. Για δύο στελέχη με MICs στη μεροπενέμη 8 και 4 mg/L έγιναν επιπλέον πειράματα με συγκέντρωση μεροπενέμης ίση με 0.5 x MIC του κάθε στελέχους. Αυτό δεν έγινε για τα υπόλοιπα στελέχη, με MICs στη μεροπενέμη 16 και 32 mg/L, καθώς συγκέντρωση μεροπενέμης 0.5 x MIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι περίπου ίση με τη συγκέντρωση των 10mg/L που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα. Η συγκέντρωση της τιγεκυκλίνης διατηρήθηκε σταθερή σε όλα τα πειράματα (1.3mg/L).

B) τη μέθοδο της σκακιάρας (CB)

Γ) τις τρεις μεθόδους των Etest που έχουν αναφερθεί ανωτέρω.

Τα στελέχη που μελετήθηκαν ήσαν όλα μη ευαίσθητα στη μεροπενέμη (εύρος MIC: 4-32mg/l) και στην τιγεκυκλίνη (εύρος MIC: 2-32mg/l).

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8.8.

Πίνακας 8.8. Αποτελέσματα ελέγχου συνέργειας συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης											
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/ Κλώνος	MIC (mg/L)		CB	Μέθοδοι Etest : FICI ή μορφή αλληλεπίδρασης)			ΚΘΧ: Διο ₁₀ CFU/mL μεταξύ συνδυασμού και του πιο δραστικού αντιβιοτικού/ μορφή αλληλεπίδρασης		
			TIG	MEM		FICI	MIC/MIC	CROSS-F	AGAR	TIG(1.3mg/L) MEM(0.5xMIC)	TIG(1.3mg/L) MEM (10mg/L)
1	372 PAP	KPC/F	2	16	1	1.25	0.52	ΑΔ	ΔΕ	-1.4/ΑΔ	0/ΑΔ
2	399 PAG	KPC/B	2	8	1	2	2	ΑΔ	-0.3/ΑΔ	-0.6/ΑΔ	-0.8/ΑΔ
3	42 LAR	KPC/B	2	4	1.5	1.3	2	ΑΔ	-0.7/ΑΔ	-8.4/ ΣΥΝ	0/ΑΔ
4	418	KPC/G	4	32	0.75	2	2	ΣΥΝ	ΔΕ	-1.3/ΑΔ	0/ΑΔ
5	257 THG	KPC/A	4	16	0.5	2	1.25	ΑΔ	ΔΕ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
6	462	VIM/D	8	16	0.5	2	2	ΣΥΝ	ΔΕ	-0.7/ΑΔ	0/ΑΔ
7	274	KPC/A	8	16	0.53	1	2	ΣΥΝ	ΔΕ	-5.8/ ΣΥΝ	0/ΑΔ
8	395	VIM/D	8	16	0.63	2	2	ΣΥΝ	ΔΕ	-0.3/ΑΔ	0/ΑΔ
9	292 ATT	OXA/E	8	16	1	2	2	ΣΥΝ	ΔΕ	-0.7/ΑΔ	-0.4/ ΑΔ
10	35 THR	VIM/E	16	16	2	0.6	0.8	ΑΘΡ	ΔΕ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
11	206 KAT	KPC/B	32	16	1.5	2	2	ΣΥΝ	ΔΕ	0/ΑΔ	0/ΑΔ
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)					2/11 (18%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	6/11 (55%)	2/11(18%)		
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)					6/11 (55%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	1/11(9%)			

TIG:τιγκεκυκλίνη, MEM:μεροπενέμη.

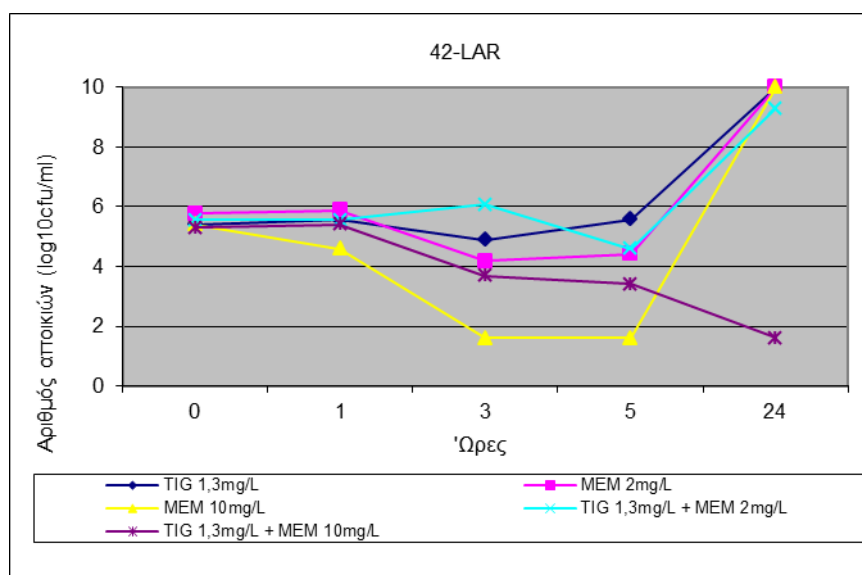
Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης / μεροπενέμης με τη μέθοδο της ΚΘΧ έδειξε συνέργεια έναντι **δύο στελεχών από τα 11 (18%)** (Διάγραμμα 4).

Η μέθοδος της σκακιάρας έδειξε συνέργεια έναντι επίσης δύο στελεχών, διαφορετικών όμως από αυτά που ανέδειξε η ΚΘΧ. Τα αποτελέσματά της ήταν κυρίως αθροιστικά, σε ποσοστό 55%.

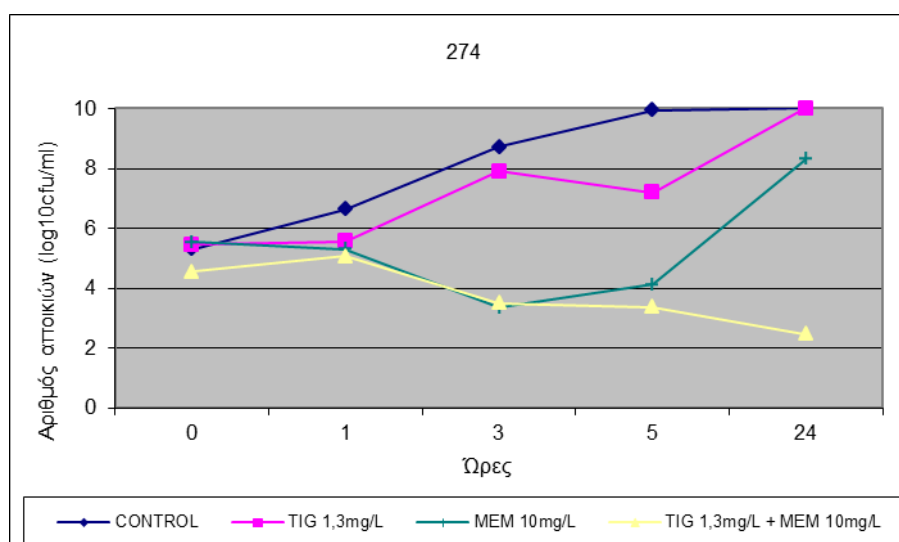
Από τις μεθόδους των Etest, αυτή του άγαρ/ Etest είχε αρκετά συνεργικά αποτελέσματα (55%), αντίθετα με τις άλλες δύο, που δεν είχαν κανένα, παρά μόνον πενιχρά αθροιστικά (18%).

Δεν διαπιστώθηκε συνέργεια σε στιγμές άλλες πλην των 24 ωρών.

Διάγραμμα 4. Καμπύλες θανάτωσης στελεχών που έδειξαν συνέργεια σε συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης / μεροπενέμης.



Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους 42-LAR όπου φαίνεται συνέργεια στις 24h του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης 1.3 mg/L με μεροπενέμη 10 mg/L , όχι όμως και με μεροπενέμη 2 mg/L (αδιαφορία).



Καμπύλη θανάτωσης του στελέχους 274 όπου φαίνεται συνέργεια στις 24h του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης 1.3 mg/L με μεροπενέμη 10 mg/L.

8.6. Μελέτη βακτηριοκτόνου δράσης συνδυασμών

8.6.1 Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης

Η βακτηριοκτόνος δράση του συνδυασμού φαίνεται στον Πίνακα 8.9.

Πίνακας 8.9 Βακτηριοκτόνος δράση συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης με τη μέθοδο ΚΘΧ								
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/Κλώνος	MIC (mg/L)		Χρονικές στιγμές κατά τις οποίες παρατηρήθηκε βακτηριοκτόνος δράση			
			TIG	COL	COL (0.5xMIC)	TIG+ COL (0.5xMIC)	COL (2mg/L)	TIG+ COL (2mg/L)
1	372 PAP	KPC/F	2	1	1, 3, 5h	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5h	1, 3, 5h
2	462	VIM/D	8	1	3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
3	274	KPC/A	8	1	1, 3, 5, 24h	3, 5, 24h	3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
4	395	VIM/D	8	1	3, 5, 24h	3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h	3, 5, 24h
5	100309595	KPC/C	2	2	-	24h	-	-
6	418	KPC/G	4	4	ΔΕ	ΔΕ	-	-
7	100185535	KPC/D	8	16	ΔΕ	ΔΕ	-	-
8	399	KPC/B	2	32	ΔΕ	ΔΕ	-	-
9	100271992	KPC/C	1	32	ΔΕ	ΔΕ	-	24h
10	100183978	KPC/C	4	>32	ΔΕ	ΔΕ	-	-
11	261	KPC/A	8	>32	ΔΕ	ΔΕ	-	-
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση στις 24h/ (%)					3 (60%)	5 (100%)	3 (27%)	4 (36%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση οποιαδήποτε ώρα/ (%)					4 (80%)	5 (100%)	4 (36%)	5 (45%)

ΔΕ: δεν έγινε (δεν εφαρμόζεται καθώς συγκέντρωση κολιστίνης 0.5xMIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι ίση ή μεγαλύτερη από τη θεωρούμενη ως επιτεύξιμη στον ορό συγκέντρωση των 2mg/L).

Όπως φαίνεται, οι συνδυασμοί με κολιστίνη, τόσο σε υποανασταλτική συγκέντρωση (0.5x MIC) όσο και στα 2mg/L, ήταν βακτηριοκτόνοι έναντι όλων των στελεχών με MIC στην κολιστίνη 1 mg/L (4 στελέχη). Ο συνδυασμός με υποανασταλτική συγκέντρωση κολιστίνης ήταν επίσης βακτηριοκτόνος έναντι στελέχους με MIC 2 mg/L και ο συνδυασμός με 2 mg/L ήταν βακτηριοκτόνος έναντι στελέχους ανθεκτικού στην κολιστίνη. Βακτηριοκτόνος δράση των συνδυασμών παρατηρήθηκε και στις περισσότερες άλλες χρονικές στιγμές (πλην των 24 ωρών) της καμπύλης θανάτωσης των στελεχών αυτών. Στον πίνακα φαίνεται επίσης ότι στα στελέχη με MIC στην κολιστίνη ≤ 1 mg/L, η βακτηριοκτόνος δράση των συνδυασμών συνοδεύτηκε από βακτηριοκτόνο δράση που άσκησε η κολιστίνη μόνη της. Αυτό δε συνέβη στα άλλα δύο στελέχη με βακτηριοκτόνο δράση του συνδυασμού, όπου η

MIC στην κολιστίνη ήταν 2 και 32 αντίστοιχα. Η τιγκεκυκλίνη, ως βακτηριοστατικός παράγων, δεν είχε, όπως αναμενόταν, καμιά βακτηριοκτόνο δράση, αλλά άσκησε τη βακτηριοστατική δράση της στο μοναδικό ευαίσθητο στην τιγκεκυκλίνη στέλεχος (MIC 1 mg/L).

8.6.2 Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης

Η βακτηριοκτόνος δράση του συνδυασμού φαίνεται στον Πίνακα 8.10. Καθώς φαίνεται, ο συνδυασμός με υποανασταλτική συγκέντρωση γενταμικίνης (0.5 x MIC) ήταν βακτηριοκτόνος έναντι δύο ευαισθήτων στη γενταμικίνη στελεχών, τα οποία επέδειξαν επίσης και συνέργεια στο συνδυασμό (ίδη Πίνακα 8.5). Ο συνδυασμός με συγκέντρωση γενταμικίνης 10 mg/L ήταν βακτηριοκτόνος για όλα τα στελέχη με MIC στη γενταμικίνη έως και 4 mg/L, στα οποία και μόνη της η γενταμικίνη (στα 10mg/L) υπήρξε βακτηριοκτόνος (ίδη Πίνακα 8.10).

Πίνακας 8.10.Βακτηριοκτόνος δράση συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης με τη μέθοδο ΚΟΧ								
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/Κλώνος	MIC (mg/L)		Χρονικές στιγμές κατά τις οποίες παρατηρήθηκε βακτηριοκτόνος δράση			
			TIG	GN	GN (0.5xMIC)	TIG+ GN (0.5xMIC)	GN (10mg/L)	TIG+ GN (10mg/L)
1	274	KPC/A	8	0.5	-	-	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
2	257	KPC/B	8	1	-	-	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
3	100309422	KPC/C	8	1	-	-	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
4	292 ΑΤΤ	OXA/E	8	1	-	-	1, 3, 5, 24h	3, 5, 24h
5	937	KPC/A	2	2	-	24h	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
6	345	NDM/C	16	2	5h	5, 24h	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
7	206 ΚΑΤ	KPC/B	>16	2	-	-	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
8	382	KPC/B	4	4	-	-	1, 3, 5, 24h	1, 3, 5, 24h
9	287	KPC/A	4	128	-	-	-	-
10	395	VIM/D	8	128	ΔΕ	ΔΕ	-	-
11	462	VIM/D	8	256	ΔΕ	ΔΕ	-	-
12	261	KPC/A	8	>256	ΔΕ	ΔΕ	-	-
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση στις 24h/ (%)					0(0%)	2 (22%)	8 (73%)	8 (73%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση οποιαδήποτε ώρα/ (%)					1 (11%)	5 (22%)	8 (73%)	8 (73%)

ΔΕ: δεν έγινε (δεν εφαρμόζεται καθώς συγκέντρωση γενταμικίνης 0.5xMIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι ίση ή μεγαλύτερη από τη θεωρούμενη ως επιτεύξιμη στον ορό συγκέντρωση των 10mg/L).

8.6.3 Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης

Η βακτηριοκτόνος δράση του συνδυασμού φαίνεται στον Πίνακα 8.11.

Πίνακας 8.11. Βακτηριοκτόνος δράση συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης με τη μέθοδο ΚΘΧ								
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/Κλώνος	MIC (mg/L)		Χρονικές στιγμές κατά τις οποίες παρατηρήθηκε βακτηριοκτόνος δράση			
			TIG	FOS	FOS (0.5xMIC)	TIG+ FOS (0.5xMIC)	FOS (300mg/L)	TIG+ FOS (300mg/L)
1	418	KPC/G	4	32	-	-	-	-
2	382	KPC/B	4	32	-	-	3, 5h	3, 5h
3	211	VIM/H	4	64	-	-	24 h	24 h
4	334	VIM/A	4	32	-	-	5,24 h	5,24 h
5	296	KPC/A	4	32	-	-	-	5,24 h
6	257	KPC/B	8	16	-	-	3, 5h	3, 5h
7	462	VIM/D	8	32	-	-	3,5,24 h	3,5,24 h
8	274	KPC/A	8	16	-	-	3,5,24 h	3,5,24 h
9	261	KPC/A	8	32	-	-	-	24h
10	287	KPC/A	4	32	-	-	3, 5h	3, 5h
11	391	KPC/A	4	32	-	-	-	-
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση στις 24h/ (%)					0 (0%)	0 (0%)	4 (36%)	6 (55%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση οποιαδήποτε ώρα/ (%)					0 (0%)	0 (0%)	7 (64%)	9 (82%)

Όπως φαίνεται, ο συνδυασμός με 300 mg/L φωσφομυκίνης ήταν βακτηριοκτόνος για το 55% των στελεχών στις 24 ώρες και στο 82% των στελεχών σε διάφορες χρονικές στιγμές μέτρησης της βακτηριοκτόνου δραστηριότητας στη διάρκεια της καμπύλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αν και όχι όλες εκείνες στις οποίες το στέλεχος ήταν ευαίσθητο, και η φωσφομυκίνη μόνη της εκδήλωσε επίσης βακτηριοκτόνο δράση. Σημειώνεται ότι αυτό συνέβη και έναντι του μοναδικού ανθεκτικού στελέχους με MIC 64 mg/L. Η υποανασταλτική συγκέντρωση φωσφομυκίνης (0.5 x MIC) έδειξε μόνον σποραδική βακτηριοστατική δραστηριότητα.

8.6.4 Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης

Η βακτηριοκτόνος δράση του συνδυασμού φαίνεται στον Πίνακα 8.12. Ο συνδυασμός με συγκέντρωση μεροπενέμης 30mg/l ήταν βακτηριοκτόνος για τα περισσότερα στελέχη (82% στις 24 ώρες και 91% σε οποιαδήποτε ώρα), στα οποία και η μεροπενέμη μόνη της στα 30mg/L ήταν επίσης βακτηριοκτόνος. Ο συνδυασμός με συγκέντρωση 10mg/L μεροπενέμης έδειξε βακτηριοκτόνο δραστηριότητα για 6 (55%) στελέχη σε διάφορες στιγμές, όπως και η μεροπενέμη μόνη της στα 10mg/L.

Πίνακας 8.12.Βακτηριοκτόνος δράση συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης με τη μέθοδο ΚΘΧ										
Α/α	Στέλεχος	Τύπος/Κλώνος	MIC (mg/L)		Χρονικές στιγμές κατά τις οποίες παρατηρήθηκε βακτηριοκτόνος δράση					
			TIG	MEM	MEM (0.5xMIC)	TIG+ MEM (0.5xMIC)	MEM (10mg/L)	TIG+ MEM (10mg/L)	MEM (30mg/L)	TIG+ MEM (30mg/L)
1	372 PAP	KPC/F	2	1	ΔΕ	ΔΕ	3,5 h	3,5 h	3,5 h	3,5 h
2	399 PAG	KPC/B	8	1	-	-	3 h	-	3,5,24 h	3,5,24 h
3	42 LAR	KPC/B	8	1	-	-	3,5 h	24 h	5, 24 h	3,5,24 h
4	418	KPC/G	8	1	ΔΕ	ΔΕ	-	-	3,5,24 h	5,24 h
5	257 THG	KPC/A	2	2	ΔΕ	ΔΕ	5 h	-	3,5,24 h	24 h
6	462	VIM/D	4	4	ΔΕ	ΔΕ	3,5 h	5 h	3,5,24 h	3,5,24 h
7	274	KPC/A	8	16	ΔΕ	ΔΕ	-	-	3,5,24 h	3,5,24 h
8	395	VIM/D	2	32	ΔΕ	ΔΕ	-	5 h	3,5,24 h	3,5,24 h
9	292 ATT	OXA/E	1	32	ΔΕ	ΔΕ	-	-	-	-
10	35 THR	VIM/E	4	>32	ΔΕ	ΔΕ	3,5 h	5 h	3,5,24 h	5,24 h
11	206 KAT	KPC/B	8	>32	ΔΕ	ΔΕ	5 h	5 h	3,5,24 h	5,24 h
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση στις 24h/ (%)					0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9%)	9(82%)	9(82%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση οποιαδήποτε ώρα/ (%)					0 (0%)	0 (0%)	7 (64%)	6 (55%)	10(91%)	10(91%)

ΔΕ: δεν έγινε (δεν εφαρμόζεται καθώς συγκέντρωση μεροπενέμης 0.5 x MIC για τα συγκεκριμένα στελέχη είναι περίπου ίση με τη συγκέντρωση των 10mg/L που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα).

8.7 Συνολικά αποτελέσματα μελέτης συνέργειας - βακτηριοκτονίας αντιμικροβιακών και συνδυασμών τους

Τα αποτελέσματα των μελετών εμφανίζονται συνολικά στον Πίνακα 8.13.

Πίνακας 8.13 Συνολικά αποτελέσματα μελετών συνέργειας												
Α/α	Στέλεχος	Καρβα πνευμιάση/Κλώνος	CB		Μέθοδοι Etest (FICI/αλληλεπίδραση ή ερμηνεία)			ΚΘΧ ($\Delta\log_{10}$ CFU/mL μεταξύ αρχικού και τελικού ενοφθαλμίσματος/αλληλεπίδραση)				
			FICI/ αλληλεπίδραση	MIC/MIC	CROSS-F	AGAR	TIG(1.3mg/L) COL (0.5xMIC)	TIG(1.3mg/L) COL (2mg/L)				
Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/κολιστίνης												
1	372 PAP	KPC/F	0.63/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-4.30/ΣΥΝ	-1.65/ΑΔ				
2	462	VIM/D	0.63/ΑΘΡ	0.40/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-3.81/ΑΔ	-3.78/ΑΔ				
3	274	KPC/A	1.00/ΑΘΡ	0.30/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-4.00/ΑΔ	-3.93/ΑΔ				
4	395	VIM/D	1.00/ΑΘΡ	0.40/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-3.91/ΑΔ	-3.91/ΑΔ				
5	100309595	KPC/C	0.52/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	ΑΘΡ	-3.06/ΣΥΝ	-2.30/ΣΥΝ				
6	418	KPC/G	0.75/ΑΘΡ	0.30/ΣΥΝ	1.10/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	4.55/ΑΔ				
7	100185535	KPC/D	0.25/ΣΥΝ	0.40/ΣΥΝ	0.70/ΑΘΡ	ΣΥΝ	ΔΕ	1.10/ΑΔ				
8	399 PAG	KPC/B	0.28/ΣΥΝ	1.16/ΑΔ	0.91/ΑΘΡ	ΣΥΝ	ΔΕ	-2.80/ΣΥΝ				
9	100271992	KPC/C	0.50/ΣΥΝ	1.00/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	ΣΥΝ	ΔΕ	-3.30/ΑΔ				
10	100183978	KPC/C	0.31/ΣΥΝ	0.40/ΣΥΝ	0.75/ΑΘΡ	ΣΥΝ	ΔΕ	0.30/ΑΔ				
11	261	KPC/A	0.16/ΣΥΝ	0.20/ΣΥΝ	1.25/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	3.30/ΑΔ				
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση/ (%)								5/5 (100%)	4/11 (36%)			
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)								5/11 (45%)	7/11 (64%)	0/11 (0%)	6/11 (55%)	3/11 (27%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)								6/11 (55%)	2/11 (18%)	5/11 (45%)	1/11 (9%)	
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση συνέργειας/ (%)												4/16 (25%)
Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/γενταμικίνης												
1	274	KPC/A	0.75/ΑΘΡ	0.60/ΑΘΡ	1.50/ΑΔ	ΑΔ	3.49/ΑΔ	-4.10/ΑΔ				
2	257	KPC/B	0.75/ΑΘΡ	1.20/ΑΔ	1.30/ΑΔ	ΑΔ	4.27/ΑΔ	-3.85/ΑΔ				
3	100309422	KPC/C	0.75/ΑΘΡ	1.50/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	4.62/ΑΔ	-3.60/ΑΔ				
4	292 ΑΤΤ	ΟΧΑ/Ε	0.75/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	4.67/ΑΔ	-3.60/ΑΔ				
5	937	KPC/A	0.75/ΑΘΡ	1.50/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-3.74/ΣΥΝ	-3.74/ΑΔ				
6	345	NDM/C	0.50/ΣΥΝ	0.90/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	-3.85/ΣΥΝ	-3.85/ΑΔ				
7	206 ΚΑΤ	KPC/B	1.00/ΑΘΡ	1.41/ΑΔ	1.41/ΑΔ	ΑΔ	3.80/ΑΔ	-3.85/ΑΔ				
8	382	KPC/B	0.56/ΑΘΡ	0.70/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	ΑΔ	4.34/ΑΔ	-3.30/ΑΔ				
9	287	KPC/A	0.75/ΑΘΡ	0.70/ΑΘΡ	1.50/ΑΔ	ΑΔ	ΔΕ	3.70/ΑΔ				
10	395	VIM/D	0.51/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	ΔΕ	4.24/ΑΔ				
11	462	VIM/D	0.50/ΣΥΝ	0.30/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	ΔΕ	4.62/ΑΔ				
12	261	KPC/A	1.00/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	ΔΕ	4.40/ΑΔ				
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση/ (%)								2/8(25%)	8/12 (67%)			
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)								2/12 (17%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	2/12 (17%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)								10/12 (83%)	5/12 (42%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)	
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση συνέργειας/ (%)												2/20 (10%)
Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/φωσφομικίνης												
								TIG(1.3mg/L) FOS (0.5xMIC)	TIG(1.3mg/L) FOS(300mg/L)			

1	418	KPC/G	ΔΕ	1.00/ΑΘΡ	1.50/ΑΔ	ΣΥΝ	3.52/ΑΔ	0.08/ΑΔ			
2	382	KPC/B	ΔΕ	1.40/ΑΔ	1.20/ΑΔ	ΑΔ	5.10/ΑΔ	4.14/ΑΔ			
3	211	VIM/H	ΔΕ	0.35/ΣΥΝ	1.40/ΑΔ	ΣΥΝ	3.00/ΑΔ	-3.52/ΑΔ			
4	334	VIM/A	ΔΕ	0.40/ΣΥΝ	0.60/ΑΘΡ	ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	-4.00/ΑΔ			
5	296	KPC/A	ΔΕ	0.25/ΣΥΝ	0.40/ΣΥΝ	ΣΥΝ	2.65/ΑΔ	-3.27/ΣΥΝ			
6	257	KPC/B	ΔΕ	0.10/ΣΥΝ	1.40/ΑΔ	ΑΘΡ	4.50/ΑΔ	3.90/ΑΔ			
7	462	VIM/D	ΔΕ	0.25/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	3.43/ΑΔ	-4.18/ΑΔ			
8	274	KPC/A	ΔΕ	0.80/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	3.60/ΑΔ	-4.30/ΑΔ			
9	261	KPC/A	ΔΕ	0.90/ΑΘΡ	1.25/ΑΔ	ΣΥΝ	3.54/ΑΔ	-3.81/ΑΔ			
10	287	KPC/A	ΔΕ	0.75/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	3.70/ΑΔ	0.70/ΑΔ			
11	391	KPC/A	ΔΕ	0.40/ΣΥΝ	1.40/ΑΔ	ΣΥΝ	3.80/ΑΔ	0.40/ΑΔ			
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση/ (%)							0/11 (0%)	6/11(55%)			
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)								6/11(55%)	1/11(9%)	9/11(82%)	1/11(9%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)								4/11(36%)	1/11(9%)	1/11(9%)	
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση συνέργειας/ (%)											1/22 (4.5%)
Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης/μεροπενέμης							TIG(1.3mg/L)	TIG(1.3mg/L)	TIG(1.3mg/L)		
							MEM(0.5xMIC)	MEM(10mg/L)	MEM(30mg/L)		
1	372 PAP	KPC/F	1.00/ΑΘΡ	1.25/ΑΔ	0.52/ΑΘΡ	ΑΔ	ΔΕ	2.85/ΑΔ	-3.85/ΑΔ		
2	399 PAG	KPC/B	1.00/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	4.23/ΑΔ	4.03/ΑΔ	-4.15/ΑΔ		
3	42 LAR	KPC/B	1.50/ΑΔ	1.30/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΑΔ	3.74/ΑΔ	-3.70/ΣΥΝ	-4.04/ΑΔ		
4	418	KPC/G	0.75/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	3.10/ΑΔ	-4.48/ΑΔ		
5	257 THG	KPC/A	0.50/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	1.25/ΑΔ	ΑΔ	ΔΕ	4.40/ΑΔ	-3.93/ΑΔ		
6	462	VIM/D	0.50/ΣΥΝ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	4.10/ΑΔ	-3.91/ΑΔ		
7	274	KPC/A	0.53/ΑΘΡ	1.00/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	-2.08/ΣΥΝ	-4.88/ΑΔ		
8	395	VIM/D	0.63/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	3.95/ΑΔ	-3.95/ΑΔ		
9	292 ATT	OXA/E	1.00/ΑΘΡ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	3.80/ΑΔ	4.35/ΑΔ		
10	35 THR	VIM/E	2.00/ΑΔ	0.60/ΑΘΡ	0.80/ΑΘΡ	ΑΘΡ	ΔΕ	4.46/ΑΔ	-3.88/ΑΔ		
11	206 KAT	KPC/B	1.50/ΑΔ	2.00/ΑΔ	2.00/ΑΔ	ΣΥΝ	ΔΕ	4.28/ΑΔ	-3.95/ΑΔ		
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε βακτηριοκτόνος δράση/ (%)							0/2(0%)	1/11(9%)	10/11(91%)		
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)							2/11 (18%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	6/11 (55%)	2/11(18%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)							6/11 (55%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	1/11 (9%)	
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση συνέργειας/ (%)											2/24 (8.3%)
ΣΥΝΟΛΙΚΑ											
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε συνέργεια/ (%)							9/34 (26.5%)	14/45 (31.1%)	1/45 (2.2%)	21/45 (46.7%)	8/45 (17.7%)
Αρ. στελεχών όπου εκδηλώθηκε αθροιστική δράση/ (%)							22/34 (64.7%)	13/45 (28.9%)	9/45 (20.0%)	3/45 (6.7%)	
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση συνέργειας/ (%)							26.5%	31.1%	2.2%	46.7%	9/82 (11%)
Αρ. συνδυασμών με εκδήλωση βακτηριοκτόνου δράσης/ (%)											36/82 (43.9%)

CB: μέθοδος σκακιέρας (checkerboard), MIC/MIC: μέθοδος Etest MIC/MIC ratio («αποτυπώματος»), CROSS-F: μέθοδος Etest σχηματισμού σταυρού (cross formation), AGAR: μέθοδος άγαρ/Etest, ΑΔ:αδιαφορία, ΑΘΡ: αθροιστική δράση, ΣΥΝ: συνέργεια.ΔΕ: δεν έγινε.

Οι συνεργικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με έντονους χαρακτήρες και γραμμοσκιασμένες. Οι βακτηριοκτόνες δράσεις εμφανίζονται με έντονους χαρακτήρες.

α) *Συνολικά αποτελέσματα με τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Μέθοδος Αναφοράς)*

Από τους **82** συνδυασμούς που μελετήθηκαν, συνέργεια παρατηρήθηκε σε **9 συνδυασμούς (11%)** (Πίνακας 8.13). Όλοι οι άλλοι συνδυασμοί κατέληξαν σε αδιαφορία. Σε κανέναν συνδυασμό δεν παρατηρήθηκε ανταγωνισμός. Συνέργεια διαπιστώθηκε στους 4 από τους 16 συνδυασμούς που περιείχαν κολιστίνη (25%), 2 από τους 20 συνδυασμούς που περιείχαν γενταμικίνη (10%), έναν από τους 22 συνδυασμούς που περιείχαν φωσφομυκίνη (4.5%) και 2 από τους 24 συνδυασμούς που περιείχαν μεροπενέμη (8.3%). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της συνέργειας με την αντοχή ή ευαισθησία των στελεχών.

Βακτηριοκτόνος δράση παρατηρήθηκε σε 36 από τους 82 συνδυασμούς (43.9%) (Πίνακας 8.13). Συγκεκριμένα, 9 (56.3%) συνδυασμοί με κολιστίνη, 10 (50%) με γενταμικίνη, 6 (27.3%) με φωσφομυκίνη και 11 (45.8%) με μεροπενέμη, ήταν βακτηριοκτόνοι.

β) *Συνολικά αποτελέσματα με τη μέθοδο της σκακιέρας (Checkerboard method)*

Από τους 34 συνδυασμούς που μελετήθηκαν, συνέργεια παρατηρήθηκε σε 9 συνδυασμούς (26.5%) και αθροιστική δράση σε 22 (64.7%) (Πίνακας 8.13). Οι υπόλοιποι τρεις συνδυασμοί έδειξαν αδιαφορία. Ανταγωνισμός δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν.

γ) *Συνολικά αποτελέσματα με τη μεθοδολογία Etest*

Το υψηλότερο ποσοστό συνέργειας παρατηρήθηκε με τη μέθοδο άγαρ/ Etest (46.7%) και ακολούθησε η μέθοδος MIC/MIC ratio (του αποτυπώματος) (31.1%) (Πίνακας 8.13). Η μέθοδος του σχηματισμού σταυρού έδωσε το χαμηλότερο ποσοστό συνεργείας για το σύνολο των συνδυασμών (2.2%), αναδεικνύοντας μόνο μικρή αθροιστική δράση (20% των συνδυασμών).

8.8. Συμφωνία μεταξύ των μεθόδων μελέτης συνέργειας

Ως μέθοδος αναφοράς και μέτρο σύγκρισης των διαφόρων μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (Ιδε κεφάλαιο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ).

8.8.1. Συμφωνία μεταξύ των διαφόρων μεθόδων με τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ).

Ο βαθμός συμφωνίας των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.14.

Πίνακας 8.14. Συμφωνία των διαφόρων μεθόδων με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ.

Μέθοδος	Αποτελέσματα (%)				Επιτυχία [§]	Συντελεστής Cohen's kappa (κ)	Ερμηνεία
	Παρατηρηθείσα συμφωνία	Ψευδώς αρνητικά	Ψευδώς Θετικά				
<i>Τιγκεκυκλίνη/κολιστίνη</i>							
CB	45.5	18.2	36.4	33.3	-0.14	Πτωχή	
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	9.1	27.3	63.6	0.0	-0.62	Πτωχή	
Σχηματισμός σταυρού	72.7	27.3	0.0	0.0	0.00	Πτωχή	
Άγαρ/Etest	36.4	18.2	45.5	33.3	-0.22	Πτωχή	
<i>Τιγκεκυκλίνη/γενταμικίνη</i>							
CB	83.3	8.3	8.3	50.0	0.40	Κάποια	
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	75.0	16.7	8.3	0.0	-0.13	Πτωχή	
Σχηματισμός σταυρού	83.3	16.7	0.0	0.0	0.00	Πτωχή	
Άγαρ/Etest	83.3	16.7	0.0	0.0	0.00	Πτωχή	
<i>Τιγκεκυκλίνη/φωσφομυκίνη</i>							
CB	-	-	-	-			
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	54.5	0.0	45.5	100	0.00	Πτωχή	
Σχηματισμός σταυρού	100	0.0	0.0	100	1.00	Καλή	
Άγαρ/Etest	27.3	0.0	72.7	100	0.04	Πτωχή	
<i>Τιγκεκυκλίνη/μεροπενέμη</i>							
CB	63.6	18.2	18.2	0.0	-0.22	Πτωχή	
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	81.8	18.2	0.0	0.0	0.00	Πτωχή	
Σχηματισμός σταυρού	81.8	18.2	0.0	0.0	0.00	Πτωχή	
Άγαρ/Etest	45.5	9.1	45.5	50.0	-0.03	Πτωχή	
<i>Όλοι οι συνδυασμοί</i>							
CB	64.7	14.7	20.6	28.6	0.02	Πτωχή	
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	55.6	15.6	28.9	12.5	-0.17	Πτωχή	
Σχηματισμός σταυρού	84.4	15.6	0.0	12.5	0.19	Πτωχή	
Άγαρ/Etest	48.9	11.1	40.0	37.5	-0.07	Πτωχή	

[§]Επιτυχία ανίχνευσης συνέργειας που προσδιορίστηκε από την ΚΘΧ.

A) Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-κολιστίνης:

Η μέθοδος με το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρηθείσας συμφωνίας (73%) ήταν η μέθοδος Etest σχηματισμού σταυρού. Ωστόσο, αυτή απέτυχε να αναδείξει οποιαδήποτε περίπτωση συνεργείας που ανιχνεύθηκε από την ΚΘΧ και έδωσε τιμή κ 0.00, που δείχνει πτωχή συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς. Δεύτερη καλύτερη μέθοδος αναδείχθηκε η μέθοδος της σκακιέρας, με ποσοστό παρατηρηθείσας συμφωνίας 46%, 33% επιτυχία ανίχνευσης συνεργείας, πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (36%) και συντελεστή κ -0.14 (πτωχή συμφωνία). Η χειρότερη μέθοδος φάνηκε να είναι η μέθοδος του αποτυπώματος (MIC/MIC ratio), με ποσοστό συμφωνίας 9% και 64% ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Όλες οι μέθοδοι έδειξαν στατιστικά πτωχή συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς.

B) Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-γενταμικίνης:

Στο συνδυασμό αυτόν, σε όλες τις μεθόδους παρατηρήθηκε συμφωνία με την ΚΘΧ στο 83% των περιπτώσεων, πλην αυτής του αποτυπώματος με συμφωνία στο 75%. Από αυτές, μόνον η μέθοδος της σκακιέρας μπόρεσε να αναδείξει συνέργεια επιβεβαιωμένη από την ΚΘΧ (την μία από τις δύο περιπτώσεις) ενώ οι υπόλοιπες καμία. Έτσι, με βάση το συντελεστή κ , η σκακιέρα είχε κάποια συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς (κ : 0.40), ενώ οι άλλες πτωχή (κ : -0.13-0.00).

Γ) Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-φωσφομυκίνης:

Εδώ συγκρίθηκαν μόνον οι τρεις μεθοδολογίες Etest με την ΚΘΧ, καθώς η μέθοδος της σκακιέρας δεν αποτελεί κατάλληλη μέθοδο εκτίμησης της δράσεως της φωσφομυκίνης. Από αυτές, η μέθοδος του σχηματισμού σταυρού έδειξε άριστη συσχέτιση με την ΚΘΧ (ποσοστό παρατηρηθείσας συμφωνίας 100%), ενώ κατόρθωσε να ανιχνεύσει τη μοναδική περίπτωση συνεργείας που διαπίστωσε η ΚΘΧ (0% ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα), ώστε η στατιστική συμφωνία με βάση το συντελεστή κ κρίθηκε καλή (κ : 1.00). Οι άλλες δύο μέθοδοι (του αποτυπώματος και άγαρ/Etest) υπερέβαλαν στην εκτίμηση της συνέργειας, παράγοντας υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (46% και 73%) και έδωσαν τιμές κ 0.00 και 0.04 (στατιστικά πτωχή συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς).

Δ) Συνδυασμός τιγκεκυκλίνης-μεροπενέμης:

Την καλύτερη συσχέτιση με την ΚΘΧ έδειξαν οι μέθοδοι Etest του αποτυπώματος και σχηματισμού σταυρού (παρατηρηθείσα συμφωνία 81.8%), οι οποίες όμως απέτυχαν να αποκαλύψουν τις συνέργειες που ανίχνευσε η ΚΘΧ με αποτέλεσμα πτωχή συμφωνία (κ : 0.00). Η μέθοδος άγαρ/ Etest προέβλεψε τις μισές από τις αληθείς συνέργειες, αλλά υπερεκτίμησε σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα συνέργειας (ψευδώς θετικά αποτελέσματα 46%) με τελικό αποτέλεσμα πτωχή συμφωνία (κ : -0.03).

Συνολικά, καμία μέθοδος δεν έδειξε να συμφωνεί (στατιστική συμφωνία) με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ, παράγοντας ασήμαντες τιμές συντελεστή κ (Πίνακας 8.14). Με βάση τα ποσοστά παρατηρηθείσας συμφωνίας, η μέθοδος Etest *σχηματισμού σταυρού* ήταν η πιο συνεπής σε σχέση με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ, με συνολική παρατηρηθείσα συμφωνία 84.4%. Δεν είχε κανένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, αλλά ανίχνευσε μόνον το 12.5% του συνόλου των συνεργικών αποτελεσμάτων, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο. Ακολουθεί η μέθοδος της σκακιάρας, με ποσοστό παρατηρηθείσας συμφωνίας 64.7% και 20.6% ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Χειρότερη φάνηκε να είναι η μέθοδος άγαρ/ Etest με ποσοστό παρατηρηθείσας συμφωνίας 48.9% και 40% ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

8.8.2. Συμφωνία μεταξύ των μεθόδων Etest με τη μέθοδο της Σκακιάρας.

Οι 3 μέθοδοι Etest συγκρίθηκαν επίσης με τη μέθοδο της Σκακιάρας (Πίνακας 8.15). Διαπιστώθηκε «κάποια» συμφωνία μεταξύ της τελευταίας και των μεθόδων MIC/MIC ratio (κ : 0.29) και άγαρ/Etest (κ : 0.38). Επιπλέον, η μέθοδος άγαρ/Etest έδειξε καλή συμφωνία (κ : 0.82) με τη μέθοδο της σκακιάρας για το συνδυασμό τιγκεκυκλίνης-κολιστίνης, ενώ η μέθοδος MIC/MIC ratio έδειξε σημαντική συμφωνία (κ : 0.63) για το συνδυασμό τιγκεκυκλίνης-γενταμικίνης.

Πίνακας 8.15. Συμφωνία των μεθόδων Etest με τη μέθοδο της Σκακιέρας.

Μέθοδος Etest	Συντελεστής	
	Cohen's kappa (κ)	Ερμηνεία
<i>Τιγκεκυκλίνη/κολιστίνη</i>		
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	-0.06	Πτωχή
Σχηματισμός σταυρού	0.00	Πτωχή
Άγαρ/Etest	0.82	Καλή
<i>Τιγκεκυκλίνη/γενταμικίνη</i>		
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	0.63	Σημαντική
Σχηματισμός σταυρού	0.00	Πτωχή
Agar/Etest	0.00	Πτωχή
<i>Τιγκεκυκλίνη/μεροπενέμη</i>		
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	0.00	Πτωχή
Σχηματισμός σταυρού	0.00	Πτωχή
Άγαρ/Etest	-0.03	Πτωχή
<i>Όλοι οι συνδυασμοί*</i>		
MIC/MIC ratio (αποτυπώματος)	0.29	Κάποια
Σχηματισμός σταυρού	0.00	Πτωχή
Άγαρ/Etest	0.38	Κάποια

* πλην συνδυασμού με φωσφομυκίνη (δεν έγινε)

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της εργαστηριακής μελέτης αντιμικροβιακών συνδυασμών είναι η διερεύνηση της δράσης των συνδυαζομένων αντιβιοτικών όταν χρησιμοποιηθούν μαζί έναντι ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Η δράση αυτή μπορεί να είναι αθροιστική, δηλαδή το τελικό αποτέλεσμα να συνιστά το άθροισμα των εξατομικευμένων δράσεών τους, ή μπορεί να δρουν αδιάφορα το ένα προς το άλλο, καταλήγοντας σε αποτέλεσμα όμοιο με αυτό που θα προέκυπτε εάν χρησιμοποιούνταν μόνο το πιο δραστικό από αυτά. Μπορεί ακόμη και να δρουν ανταγωνιστικά, ώστε το τελικό αποτέλεσμα να είναι ακόμη χειρότερο. Το καλύτερο «σενάριο» είναι να δρουν συνεργικά μεταξύ τους, παράγοντας αποτέλεσμα μεγαλύτερο από το άθροισμα των επιμέρους δράσεών τους. Η συνεργική δράση των αντιβιοτικών ήταν πάντοτε επιθυμητή στο χώρο των λοιμώξεων, αλλ' έχει γίνει αντικείμενο έντονης έρευνας στην εποχή μας της επιδεινούμενης αντιμικροβιακής αντοχής, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα αντιμετώπισης παθογόνων ανθεκτικών στα περισσότερα ή και όλα τα διαθέσιμα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Με δεδομένη τη συχνότητα με την οποία χρησιμοποιείται η συνδυαστική θεραπεία για πολυανθεκτικές λοιμώξεις, την ευρύτατη βιβλιογραφία που διερευνά την υπεροχή της έναντι της μονοθεραπείας και των μεγάλων προσδοκιών που τρέφουν προς αυτήν οι θεράποντες λοιμωξιολόγοι, μια αξιόπιστη και ακριβής μέθοδος ικανή να προβλέπει τη δραστικότητα ενός συγκεκριμένου συνδυασμού θα ήταν πολύτιμη. Οι μέθοδοι που απαντώνται συχνότερα στη βιβλιογραφία είναι η Καμπύλη Θανάτωσης στο Χρόνο (Time Kill Assay) και η Μέθοδος της Σκακιάρας (Checkerboard method). Η *Καμπύλη Θανάτωσης στο Χρόνο (ΚΘΧ) (Time Kill Assay)* έχει χρησιμοποιηθεί ως μέτρο σύγκρισης από πολλούς ερευνητές (White et al. 1996, Bonapace et al. 2010, Sopirala et al. 2010, Pankey et al. 2013, Motos et al. 2019). Επιπλέον θεωρείται ότι προσφέρει τις χρησιμότερες κλινικά πληροφορίες σε σχέση με τη δράση ενός συνδυασμού (Ni et al. 2015, Doern 2014). Πρόκειται ουσιαστικά για μια παραλλαγή της μεθόδου προσδιορισμού της Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκεντρώσεως (Minimal Bactericidal Concentration- MBC) και βασίζεται σε μέτρηση σε διαδοχικές χρονικές στιγμές αποικιών που προέρχονται από καλλιεργήματα σε ζωμό του μελετούμενου μικροοργανισμού, τα οποία έχουν εκτεθεί σε κάθε ένα από τα αντιβιοτικά ξεχωριστά

όσο και στο συνδυασμό τους, με σκοπό να προσδιοριστεί ο ρυθμός της θανάτωσης του μικροβίου με την πρόοδο του χρόνου. Η μέθοδος αυτή έχει εγκριθεί γι' αυτόν το σκοπό χρήση από τον οργανισμό National Committee on Clinical Laboratory Standards των ΗΠΑ (NCCLS, που τώρα έχει μετονομαστεί σε Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) (NCCLS. 1999), και παραμένει ως σήμερα η μοναδική εργαστηριακή μέθοδος εκτίμησης αντιμικροβιακών συνδυασμών που έχει πιστοποιηθεί από έναν επίσημο φορέα. Η Μέθοδος της Σκακιάρας (*Checkerboard method*) αποτελεί μια δισδιάστατη παραλλαγή της κλασικής Μεθόδου Μικροαραιώσεων σε Ζωμό (Broth Microdilution Method) έτσι ώστε το βακτηριακό εναιώρημα προστίθεται στις υποδοχές μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης που περιέχει διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις των συνδυαζόμενων παραγόντων. Συνδυασμοί που οδηγούν σε μείωση κατά τέσσερις ή περισσότερες αραιώσεις των ατομικών MIC των αντιβιοτικών, θεωρούνται συνεργικοί. Οι αλληλεπιδράσεις εκφράζονται με το Δείκτη Κλασματικής Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Fractional Inhibitory Concentration Index-FICI) που αποτελεί το άθροισμα των ατομικών FICs των αντιβιοτικών, δηλαδή των τιμών των MICs τους όταν δρουν μόνα τους εν σχέσει με αυτές που παρουσιάζουν όταν συνυπάρχουν σε έναν συνδυασμό. Εάν ένας συνδυασμός εμφανίσει $FICI \leq 0.5$, τότε η προϋπόθεση της κατά 4 αραιώσεις μείωσης εκπληρώνεται και ο συνδυασμός ανακηρύσσεται συνεργικός, εάν βρεθεί μεταξύ του 0.5 και του 1.0 δείχνει αθροιστική δράση, εάν είναι μεταξύ 1 και 4 αδιαφορία και άνω του 4 ανταγωνισμό. Η μέθοδος της σκακιάρας εκτιμά τα αποτελέσματα της δράσης του συνδυασμού σε μία και μόνη χρονική στιγμή, αντίθετα από την ΚΘΧ, και παρέχει πληροφορίες για ανασταλτικές συγκεντρώσεις παρά για βακτηριοκτόνους δράσεις, όπως κάνει η ΚΘΧ.

Δυστυχώς, καμιά από τις μεθόδους αυτές δε χρησιμοποιείται στη ρουτίνα ενός κλινικού μικροβιολογικού εργαστηρίου για τον έλεγχο αντιμικροβιακών συνδυασμών έναντι στελεχών που απομονώνονται από πάσχοντες ασθενείς. Είναι και οι δύο εργώδεις, χρονοβόρες, δαπανηρές και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό. Για το λόγο αυτό, έχει επιχειρηθεί η αντικατάστασή τους από την πολύ απλούστερη μεθοδολογία των ταινιών *Κλιμακωτής Διάχυσης Αντιβιοτικών*, ευρύτερα γνωστές με την ονομασία Etest (η ονομασία αποτελεί εμπορικό όρο από συγκεκριμένη εταιρεία που κατασκευάζει τέτοιες ταινίες, όμως έχει επικρατήσει στην εργαστηριακή καθομιλουμένη). Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει τη χρήση τους, με ποικίλων

βαθμών υποσχόμενα αποτελέσματα (White et al. 1996, Bonapace et al. 2000, Manno et al. 2003, Pankey et al. 2013). Επί του παρόντος, οι μέθοδοι αυτές δεν έχουν καταφέρει να εδραιωθούν ως εναλλακτικές των δύο πρώτων (ΚΘΧ, σκακιέρας) στη ρουτίνα του μικροβιολογικού εργαστηρίου.

Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε συνδυασμούς της τιγκεκυκλίνης με είτε κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη έναντι στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση εφαρμόζοντας 5 μεθοδολογίες: την ΚΘΧ, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως συγκριτική μέθοδος αναφοράς, τη μέθοδο της σκακιέρας και 3 μεθόδους βασισμένες στη χρήση Etest: την MIC/MIC ratio («του αποτυπώματος»), τη μέθοδο του «σχηματισμού σταυρού» (Cross Formation) και τη Μέθοδο Άγαρ/Etest. Σκοπός ήταν η ανεύρεση μιας εργαστηριακής μεθόδου μελέτης συνέργειας που να δείχνει καλή συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς και να μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα σε οποιοδήποτε μικροβιολογικό εργαστήριο. Επιλέχθηκαν στελέχη που είχαν προκαλέσει κλινική λοίμωξη, παρήγαγαν διαφόρους τύπους καρβαπενεμασών και ανήκαν σε οκτώ διαφορετικούς κλώνους με βάση την ανάλυση με REP-PCR, ώστε να υπάρξει ευρεία αντιπροσώπευση τύπων πολυανθεκτικής *K.pneumoniae* στη μελέτη.

Η αλληλεπίδραση της τιγκεκυκλίνης με άλλα αντιμικροβιακά με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ βρέθηκε από την παρούσα μελέτη να έχει συνολικό συνεργικό αποτέλεσμα σε ποσοστό 11% (9 από τους 82 συνδυασμούς που μελετήθηκαν). Πιο συγκεκριμένα, συνέργεια βρέθηκε στο 25% των συνδυασμών με κολιστίνη, 10% αυτών με γενταμικίνη, 4.5% των συνδυασμών με φωσφομυκίνη και 8% αυτών με μεροπενέμη. Ψηλότερα ποσοστά συνεργείας έδωσε η μέθοδος της σκακιέρας (συνολικό ποσοστό 26.5%, και ειδικότερα για το συνδυασμό με κολιστίνη 45%, τη γενταμικίνη 17% και τη μεροπενέμη 18%). Από τις μεθόδους Etest, η μέθοδος του αποτυπώματος έδωσε συνολικό ποσοστό συνέργειας 31%, με ψηλά ποσοστά για τους συνδυασμούς με κολιστίνη και φωσφομυκίνη και πολύ χαμηλά για αυτούς με γενταμικίνη και μεροπενέμη, η μέθοδος του σχηματισμού σταυρού έδωσε χαμηλό συνολικό ποσοστό (2%), ενώ αντίθετα η μέθοδος άγαρ/Etest σταυρού έδωσε ψηλά ποσοστά συνεργείας (47% συνολικά, καθώς και ψηλά ποσοστά για όλους τους συνδυασμούς πλην αυτού με τη γενταμικίνη).

Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με *in vitro* συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης με άλλα αντιβιοτικά έναντι στελεχών CPKP. Οι βασικότερες δημοσιευμένες μελέτες φαίνονται στον Πίνακα 9.1. Παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία στα αποτελέσματα των ερευνών αυτών, που κυμαίνονται από τη συνέργεια έως και τον ανταγωνισμό (Albur et al. 2012), οι περισσότερες αναφέρουν άλλοτε άλλο βαθμό παρατηρούμενης συνέργειας (Πίνακας 9.1). Κοινό εύρημα αποτελεί η διαπίστωση συνέργειας στο συνδυασμό τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη ή πολυμυξίνη Β, είτε με τη μέθοδο της ΚΘΧ (Cobo et al. 2008, Pournaras et al. 2011, Betts et al. 2014, Barth et al. 2015) ή με τη μέθοδο της σκακιάρας (Elemam et al. 2010, Tascini et al. 2013, Gaibani et al. 2014, Stein et al. 2015, Maraki et al. 2015, Oliva et al. 2017). Συνέργεια αναφέρθηκε επίσης για το συνδυασμό της τιγκεκυκλίνης με φωσφομυκίνη με τη μέθοδο Etest έναντι στελεχών KPCKp (Samonis et al. 2012) και με γενταμικίνη έναντι στελεχών CPKP με τη σκακιάρα (Oliva et al. 2017).

Πίνακας 9.1. In vitro μελέτες εκτίμησης συνδυασμού τιγκεκυκλίνης με διάφορα αντιμικροβιακά έναντι CRKp

Μελέτη	Είδος στελεχών	Αριθμός στελεχών	Συνδυασμός	Μέθοδος Εκτίμησης Συνέργειας	Αποτέλεσμα
Cobo et al. 2008	VIMKp	1	TIG/COL	TKA	Συνέργεια
Elemam et al. 2010	KPCKp	12	PB/ είτε RIF, DOX, GN ή TIG	CB	Συνέργεια 100% για PB/TIG ή DOX ή RIF, αδιαφορία για PB/GN
Berçot et al. 2011	NDMKp	28	COL/FOS, COL/TIG	CB	Αδιαφορία
Samonis et al. 2012	KPCKp	50	FOS/είτε IMP, MEM, DOR, COL, NET ή TIG	Etest	Συνέργεια 74%/70%/74% /36%/42%/30% αντίστοιχα)
Pournaras et al. 2011	KPCKp	8	TIG/MEM, TIG/COL	TKA	Αδιαφορία για TIG-MEM Συνέργεια για TIG-COL (όλα τα στελέχη)
Albur et al. 2012	NDMKp	8	TIG/COL	TKA	Αδιαφορία ή και ανταγωνισμός
Tascini et al. 2013	KPCKp	13	COL/RIF, MEM/GN, TIG/COL, COL/GN, COL/IMP, TIG/GN, IMP/GN, COL/MEM, TIG/MEM, TIG/IMP	CB	COL/RIF: συνέργεια 100%, λοιπά: 0%-39% -Για συνδυασμούς TIG : TIG/COL, TIG/GN, TIG/MEM, TIG/IMP: συνέργεια 39%/0%/0%/0% αντίστοιχα)
Betts et al. 2014	CRE	15	TIG/COL	CB, TKA	Συνέργεια 47% για CB, που επιβεβαιώθηκε στο 85% των περιπτώσεων με TKA
Barth et al. 2015	KPCKp	2	PB/ είτε IMP, MEM ή TIG	TKA	Συνέργεια και για τα 2 στελέχη
Stein et al. 2015	KPCKp/ OXAKp	14	TIG/MEM, TIG/COL, TIG/COL/MEM, COL/MEM	CB	Συνέργεια TIG/MEM, TIG/COL, TIG/COL/MEM, COL/MEM: 14%, 64%, 50%, 14% αντίστοιχα
Gaibani et al. 2014	KPCKp	17	COL/RIF, TIG/COL	TKA, CB, Etest	TIG/COL: Συνέργεια (μόνο για τα κολιστίνη ανθεκτικά στελέχη): με τη μέθοδο CB: 88% με τη μέθοδο Etest: 25% με TKA: 0%
Maraki et al. 2015	KPCKp (κολιστίνη ανθεκτικά)	30	COL/είτε RIF, TIG, DOR, FOS, IMP, GN ή MEM	CB	Συνέργεια COL/RIF, COL/TIG, COL/DOR, COL/FOS, COL/IMP, COL/GN, COL/MEM: 100%, 33%, 33%, 20%, 13%, 7%, 3% αντίστοιχα
Oliva et al. 2017	CRKp	39	COL/ either MEM/TIG/RIF/DOR, GN/MEM, GN/TIG, MEM/ERT, COL/MEM/TIG	CB	Συνέργεια: COL/MEM 46%, COL/TIG 62%, COL/RIF 97%, COL/DOR 44%. GN/MEM: 59%, GN/TIG: 48%, MEM/ERT: 30%, COL/MEM/TIG: 95%

CRKp: *K.pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες CRE : Carba-penem Resistant *Enterobacteriaceae*

KPCKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC

VIMKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου VIM

NDMKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου NDM

OXAKp: *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση τύπου OXA-48

TKA: Time Kill Assay (Μέθοδος θανάτωσης στο Χρόνο), CB: Μέθοδος Checkerboard (σκακιέρας)

MEM: μεροπενέμη, GN: γενταμικίνη, PB: πολυμυξίνη B, RIF: ριφαμπικίνη, TIG: τιγκεκυκλίνη, COL: κολιστίνη, FOS: φωσφομυκίνη, IMP: ιμιπενέμη,

DOR: ντοριπενέμη. Τα στοιχεία για τους συνδυασμούς που περιλαμβάνουν τιγκεκυκλίνη εμφανίζονται γραμμοσκιασμένα

Τα στοιχεία για συνεργικούς συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης εμφανίζονται γραμμοσκιασμένα και με κόκκινο χρώμα.

Όσον αφορά τη συμφωνία των λοιπών μεθόδων με τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο, που στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς, αυτή φάνηκε να είναι ασήμαντη, με βάση το συντελεστή ομοφωνίας Cohen's kappa κ . Η χρήση του στατιστικού αυτού μέτρου, το οποίο αξιολογεί την πιθανότητα να παρατηρούνται περιπτώσεις τυχαίας και μόνο συμφωνίας, κρίθηκε απαραίτητη διότι οι αληθείς περιπτώσεις συνεργείας ήταν ασυνήθεις. Αυτό καθιστά πιθανό το ενδεχόμενο να προκύπτει συμφωνία των μεθόδων μόνο και μόνο επειδή η συνέργεια δε συνέβαινε στην πραγματικότητα συχνά, να πρόκειται δηλαδή για πλασματική συμφωνία. Ο συντελεστής αυτός κυμάνθηκε από 0.17 έως 0.19, που στοιχειοθετεί «πτωχή», δηλαδή ασήμαντη συμφωνία. Σημειώνεται πως η καλύτερη από τις τιμές κ επί του συνόλου των αποτελεσμάτων (0.19) η οποία πλησιάζει και στο όριο της «κάποιας» συμφωνίας ($\kappa=0.21$), αντιστοιχεί στη μέθοδο του σχηματισμού σταυρού, που στην περίπτωση του συνδυασμού τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης έδειξε πολύ καλή συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς ($\kappa=1.00$). Εάν χρησιμοποιήσουμε ως μέτρο αναφοράς τη μέθοδο της σκακιέρας για να εκτιμήσουμε τις μεθοδολογίες των Etest, θα βρούμε ότι υπήρξε «κάποια» συμφωνία της μεθόδου του αποτυπώματος ($\kappa=0.29$) καθώς και της μεθόδου άγαρ/Etest ($\kappa=0.38$) με αυτήν.

Με δεδομένα τα παρόντα ευρήματα, εξετάστηκε η υπάρχουσα βιβλιογραφία με σκοπό να διερευνηθεί ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ μεθοδολογιών μελέτης *in vitro* συνέργειας από άλλους ερευνητές. Προκειμένου να αποκτηθεί μια ευρύτερη αντίληψη επί του θέματος, η έρευνα επεκτάθηκε πέρα από την *K. pneumoniae* ή τα εντεροβακτηριακά με αντοχή στις καρβαπενέμες, και σε άλλα είδη ανθεκτικών gram-αρνητικών μικροοργανισμών για τα οποία υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία. Στον Πίνακα 9.2 παρουσιάζονται στοιχεία από μελέτες που συμπεριέλαβαν τη μέθοδο της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο και κάποια ή κάποιες από τις μεθόδους της Σκακιέρας και των Etest, στους ελέγχους συνέργειας έναντι των gram-αρνητικών μικροοργανισμών εκείνων που προσήλκυσαν το ενδιαφέρον των εκάστοτε ερευνητών. Καθώς φαίνεται, ο βαθμός συμφωνίας που προκύπτει κυμαίνεται από 0-100%, παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο βαθμό ποικιλομορφίας που είναι δυνατό να διαπιστωθεί. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται σε ανασκόπηση άλλου ερευνητή, «no two synergy methods produce comparable results» (Doern 2014).

Πίνακας 9.2. Σύγκριση μεθόδων διαπίστωσης συνέργειας αντιβιοτικών έναντι gram-αρνητικών μικροοργανισμών από δημοσιευμένες μελέτες και συμφωνία με ΚΘΧ								
Μελέτη	Είδος στελεχών	Αριθμός στελεχών*	Συνδυαζόμενα αντιβιοτικά	Μέθοδοι			Συμφωνία με ΚΘΧ	Επιβεβαίωση συνεργικών ευρημάτων άλλων μεθόδων από ΚΘΧ**
				ΚΘΧ	CB	Μέθοδοι Etest		
Cappelletty et al. 1996	<i>Pseudomonas</i>	7	AM/CAZ, FEP, TZP	•	•		0%	Κανένα συνεργικό εύρημα με το CB
White et al. 1996	ATCC strains	4	CAZ/CIP, TOB FEP/CIP, TOB	•	•	•	44-88% (CB) 63-75% (Etest)	100% και για CB και για Etest
Bonapace et al. 2000	<i>Acinetobacter</i>	10	TOB/ FEP, PIP TV/FEP, PIP	•	•	•	51% (CB) 72% (Etest)	31% για το CB/ Το Etest δεν ανέδειξε καμία συνέργεια
Pankey et al. 2005	<i>Pseudomonas</i>	31	CIP/GAT	•		•	65%	67%
Tan et al. 2007	<i>Acinetobacter</i>	13	COL/MIN	•		•	8%	Κανένα συνεργικό εύρημα με το Etest
Petersen et al. 2006	Διάφορα (συμπεριλ. στελέχη <i>Klebsiella</i>)	17	TIG/ 13 άλλα αντιβιοτικά	•	•		6%	6% (αφορούσε στέλεχος <i>Acinetobacter</i>)/ 0% για <i>Klebsiellae</i>
Principe et al. 2009	<i>Acinetobacter</i>	7	TIG/LEV, AM, IMP ή COL	•	•		50%	50%
Pankey et al. 2009	<i>Acinetobacter</i>	8	COL/MEM	•		•	62%	100%
Sopirala et al. 2010	<i>Acinetobacter</i>	8	IMP/COL, TIG	•	•	•	IMP/TIG:40% (CB), 80% (Etest) [®] IMP/COL: 75%(CB), 25%(Etest) [®]	54% για τη μέθοδο Etest, 100% για το CB
Gordon et al. 2010	<i>Acinetobacter</i>	6	COL/VA	•	•	•	67% (CB), 100%(Etest)	100% και για CB και για Etest
Pankey et al. 2011	<i>Klebsiella</i> CPKp	14	PB/ MEM, RIF	•		•	PB/MEM:79% PB/RIF:21%	100%
Tan et al. 2011	<i>Acinetobacter</i>	16	COL/TIG, RIF TIG/RIF	•	•	•	TIG/COL:44%(Etest), 62% (CB) TIG/RIF: 62% (CB), 81%(Etest) COL/RIF: 50% (και Etest και CB).	20%
Hornsey et al. 2012	Various GNB NTCC strains	11	TLV/ COL	•	•	•	64% (Etest), 81% (CB)	57% για τη μέθοδο Etest, 67% για το CB
Vidaillac et al. 2012	<i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	12	COL/ TMP, SXT, VA	•	•		COL/VA: 100% COL/TMP: 83% COL/SXT:50%	100%
Principe et al. 2013	<i>Acinetobacter</i>	13	DOR/ TIG, COL ή AM	•	•		43%	43%
Pankey et al. 2013	<i>Klebsiella</i> CPKp	31	PB/ MEM	•		•	23% (Etest Fixed ratio method) 26% (Etest cross method) 81% (Etest MIC/MIC method)	55% για τη μέθοδο MIC/MIC /Οι άλλες μέθοδοι δεν ανέδειξαν καμία συνέργεια
Betts et al. 2014	CRE	7	TIG/ COL	•	•		85%	85%
	<i>Klebsiella</i>	3					67%	67%
Nastro et al. 2014	CRE, <i>Acinetobacter</i>	11	COL/ RIF	•		•	100%	100%
Gaibani et al. 2014	<i>Klebsiella</i> CPKp	8	COL/RIF, TIG ή MEM, MEM/TIG	•	•	•	COL/RIF:100%(CB, Etest) COL/TIG: 25% (CB), 75%(Etest) COL/MEM: 63%(CB), 88%(Etest) MEM/TIG: 100% (CB, Etest)	100% για το συνδυασμό COL/RIF, 0% για όλους τους υπόλοιπους
							Συνδυασμοί με TIG: 63% (CB), 88% (Etest) Συνδυασμοί χωρίς TIG: 82% (CB), 94%(Etest)	0%

ΚΘΧ: Καμπύλη Θανατώσεως στο Χρόνο, CB: Μέθοδος Σκακιέρας, FEP: κεφετίμη, CAZ: κεφαζιδίμη, CIP: στροφλοξασίνη, TOB : τομπραμικίνη, TV: τροβαφλοξασίνη GAT: γκατιφλοξασίνη, MIN: μινοκυκλίνη, MEM: μεροπενέμη, PIP: πιπερασιλλίνη, GN: γενταμικίνη, PB: πολυμυξίνη B, RIF: ριφαμπικίνη, TIG: τιγκεκυκλίνη, COL: κολιστίνη, TEC: τεϊκοπλανίνη, IMP: ιμπενέμη, AM: αμικασίνη, TMP: τριμεθοπρίμη, SXT : τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, VA:βανκομυκίνη, LEV:λεβοφλοξασίνη, DOR:ντοριπενέμη, AMC: αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, TLV:τελαβανασίνη, TZP: πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, CPKp: *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες, CRE : *Enterobacteriaceae* ανθεκτικά στις καρβαπενεμές

Γραμμοσκιασμένα φαίνονται τα στοιχεία που αφορούν μελέτες συνδυασμών τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *Klebsiella*

*Στον πίνακα φαίνονται τα στοιχεία για όσα στελέχη μελετήθηκαν και με ΚΘΧ και με κάποια από τις άλλες μεθόδους

**Η επιβεβαίωση συνέργειας με ΚΘΧ και η συμφωνία με ΚΘΧ (τελευταία και προτελευταία στήλη) συμπίπτουν στις περιπτώσεις εκείνες όπου ΚΘΧ έλαβε χώρα μόνο όταν ένας συνδυασμός είχε δώσει συνεργικό αποτέλεσμα με κάποια άλλη μέθοδο. Στις υπόλοιπες ΚΘΧ έγινε για όλα τα στελέχη και όλους τους συνδυασμούς που ελέγχθηκαν και με τις άλλες μεθόδους.

*Αφορά τη μέθοδο "Agar/Etest", καθώς η άλλη μέθοδος Etest που χρησιμοποίησαν οι συγγραφείς (fixed ratio), δεν έδωσε κανένα συνεργικό αποτέλεσμα.

Ειδικά όσον αφορά συνδυασμούς τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *K. pneumoniae*, μόνον 3 μελέτες προσπάθησαν να διερευνήσουν αν και κατά πόσον συμφωνούν είτε η μέθοδος της σκακιέρας είτε κάποια από τις μεθοδολογίες με Etest, με την ΚΘΧ. Σε αυτές, η συνέργεια επιβεβαιώθηκε από την ΚΘΧ από 0% (Petersen et al. 2006, Gaibani et al. 2014) έως 67% (Betts et al. 2014). Οι Gaibani et al. βρήκαν υψηλά ποσοστά συμφωνίας της μεθόδου της σκακιέρας με την ΚΘΧ (63%) και των Etest (μέθοδος σταυρού)(88%), αντανακλώντας το βαθμό που ούτε η μία ούτε η άλλη μέθοδος δεν έβρισκε συνεργικό αποτέλεσμα (Πίνακας 9.2).

Προσπαθώντας κανείς να ερευνήσει τα αίτια της εντυπωσιακής ανομοιομορφίας τόσο των καταγεγραμμένων ποσοστών συνεργείας όσο και βαθμών συμφωνίας των διαφόρων μεθόδων, θα πρέπει να εμβαθύνει στη φύση καθεμιάς από αυτές. Φαίνεται πως υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη:

A. Παράμετροι εγγενείς των χρησιμοποιούμενων μεθόδων

i. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η μέθοδος της Καμπύλης Θανατώσεως στο Χρόνο (ΚΘΧ) εκτιμά το ρυθμό εξόντωσης ενός μικροοργανισμού από ένα αντιβιοτικό ή συνδυασμό αντιβιοτικών, ενώ οι μέθοδοι της Σκακιέρας και των Etest την αναστολή της ανάπτυξης του από αυτά. Με άλλα λόγια, η πρώτη μετρά βακτηριοκτόνο ενώ οι τελευταίες βακτηριοστατική δράση, που αποτελούν διαφορετικές ιδιότητες για έναν αντιμικροβιακό συνδυασμό (Pankey et al. 2013, Bonapace et al. 2002, Petersen et al. 2006, Zusman et al. 2017).

ii. Η ΚΘΧ εκτιμά τη δράση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και συνδυασμών τους, αμετάβλητων στη διάρκεια της διαδικασίας, ενώ οι μέθοδοι Σκακιέρας / Etest εκτιμούν τις βέλτιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις των δοκιμαζόμενων παραγόντων, δύο προσεγγίσεις ποιοτικά διαφορετικές.

iii. Η ΚΘΧ εκφράζει ρυθμό εξόντωσης με την πρόοδο του χρόνου, οι άλλες μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα σε μία και ορισμένη χρονική στιγμή.

iv. Η θανάτωση ενός μικροοργανισμού από τον πιο δραστικό παράγοντα στα πειράματα με ΚΘΧ μπορεί να μην αφήσει να φανεί μια πιθανή συνεργική δράση του συνδυασμού. Αυτό δε θα συμβεί στις άλλες μεθόδους.

v. Αρκετοί ερευνητές έχουν ασκήσει κριτική σχετικά με την επαναληψιμότητα της μεθόδου της Σκακίερας (Cappelletty et al. 1995, Odds et al. 2003). Στην παρούσα μελέτη τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν για το λόγο αυτό. Μια παλαιότερη μελέτη (Rand et al. 1993) βρήκε τόσο σοβαρά προβλήματα ώστε κατέληξε πως «η μέθοδος checkerboard (σκακίερας) θα πρέπει ή να μη χρησιμοποιείται καθόλου ή να γίνονται τουλάχιστον πέντε πειράματα ανά προσδιορισμό». Ενδεχομένως τούτο να αποτελεί υπερβολή, ωστόσο δίνει ένα μέτρο της περίσκεψης με την οποία κανείς πρέπει να αξιολογεί τα δημοσιευμένα αποτελέσματα σχετικών μελετών.

vi. Παρ'ότι η έννοια της αθροιστικής δράσης είναι κάπως ασαφής και οι οδηγίες προς συγγραφείς της διεθνούς επιθεώρησης Antimicrobial Agents and Chemotherapy αποτρέπουν από τη χρήση της (AAC 2006), υπάρχουν αρκετοί ερευνητές που αξιολογούν ένα αποτέλεσμα που αποτελεί άθροισμα της δράσης κάθε παράγοντα του συνδυασμού, αναγνωρίζοντας πως ο συνδυασμός δεν είναι αδιάφορος. Αυτό, παρ'όλ'αυτά, είναι ένα είδος αλληλεπίδρασης που η ΚΘΧ δεν μπορεί να ανιχνεύσει.

B. Παράμετροι που μεταβάλλονται μεταξύ των ερευνητών

Μελετώντας τη βιβλιογραφία, γίνεται φανερό πως μπορεί να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθεί ο κάθε ερευνητής:

i. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που επιλέγονται για τα πειράματα με ΚΘΧ ποικίλουν ευρέως. Μερικοί ερευνητές χρησιμοποιούν συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν κλινικά, άλλοι διάφορα πολλαπλάσια ή υποδιαίρεσεις των MIC των συνδυαζομένων παραγόντων, που μπορεί να κυμαίνονται από το $\frac{1}{4} \times \text{MIC}$ έως $4 \times \text{MIC}$. Ποικιλομορφία ενυπάρχει και μέσα στην κατηγορία «κλινικά επιτεύξιμη συγκέντρωση», καθώς αυτή είναι μια μάλλον ασαφής περιγραφή φαρμακοκινητικών παραμέτρων που μπορεί να είναι κάποια από τις C_{Max} , (μέγιστη), $C_{\text{Steady State}}$ (σταθερής κατάστασης) ή C_{Trough} (ελάχιστη) τιμές για ένα αντιβιοτικό. Και βέβαια αυτές μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος και την εστία της λοίμωξης στις οποίες αντιστοιχούν αυτές οι μετρήσεις, τη δοσολογία, καθώς και άλλα πειραματικά ή θεωρητικά στοιχεία που μπορεί να έχει στο μυαλό του κάθε ερευνητής. Τούτο

παράγει σημαντική ετερογένεια μεταξύ των πειραμάτων και πιθανότατα και των αποτελεσμάτων τους.

ii. Παρ'ότι η πιο συχνά απαντώμενη στις βιβλιογραφικές αναφορές - και πιο ορθή - χρονική στιγμή μέτρησης της βακτηριοκτόνου δράσης ενός συνδυασμού είναι οι 24 ώρες, υπάρχουν πολλοί ερευνητές που αξιολογούν και άλλες χρονικές στιγμές. Γεγονός είναι πως παρ'ότι αυτό επηρεάζει τη συγκρισιμότητα, η εύρεση ενός συνεργικού βακτηριοκτόνου αποτελέσματος σε χρονική στιγμή διαφορετική από τις 24 ώρες, ενδέχεται να είναι κλινικά σημαντική. Και πάλι τούτο μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα στην ερμηνεία των πειραματικών ευρημάτων.

iii. Μια σημαντική παράμετρος που μπορεί να αποτελέσει αίτιο ανομοιομορφίας και δυσκολίας σύγκρισης μεταξύ μελετών αντιμικροβιακών συνδυασμών είναι η ποικιλότητα των μελετουμένων στελεχών, τόσο όσον αφορά το βαθμό ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά των συνδυασμών, όσο και τις ποιοτικές διαφορές των μηχανισμών αντοχής τους. Μια συλλογή στελεχών με παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά (π.χ. αντοχή στις καρβαπενέμες), μπορεί να είναι καίρια διαφορετική από μια άλλη ομάδα ανθεκτικών στις καρβαπενέμες μικροοργανισμών που συνέλεξε ένας άλλος ερευνητής κατά τρόπους τέτοιους που να οδηγούν σε αντιφατικά ή δύσκολο να συγκριθούν αποτελέσματα.

iv. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων, η αμφιλεγόμενη αξιοπιστία αποτελεσμάτων σε περίπτωση που οι ερευνητές δεν προβούν σε επαρκείς επαναλήψεις των πειραμάτων τους (είναι γνωστά τα προβλήματα επαναληψιμότητας των σχετικών μεθόδων), οι διαφορές στα όρια ευαισθησίας ανάλογα με τα ερμηνευτικά κριτήρια που έχει χρησιμοποιήσει κάθε ερευνητής, και όπως αυτά ισχύουν κατά τη χρονική στιγμή της μελέτης, είναι όλα παράγοντες που μπορούν να συμβάλλουν στην ανομοιομορφία των συμπερασμάτων που παρατηρεί κανείς.

Είναι πιθανή η εξομάλυνση διαφορών που οφείλονται σε διαδικαστικές παραμέτρους, όπως διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ή χρόνος αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, με καλύτερη προτυποποίηση των σχετικών τεχνικών. Πράγματι, η ανάγκη για βελτιστοποίηση των *in vitro* μεθόδων ελέγχου αντιμικροβιακής συνέργειας έναντι διαφόρων τύπων ανθεκτικών μικροοργανισμών έχει διαπιστωθεί από αρκετούς ερευνητές (Foweraker et al. 2009, Zusman et al. 2013, Tangden et al.

2015, Park et al. 2016). Ωστόσο, ακόμα κι αν αυτό εν τέλει επιτευχθεί, δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η *in vivo* αποτελεσματικότητα ενός *in vitro* συνεργικού συνδυασμού. Υπάρχουν παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την *in vivo* δράση ενός συνδυασμού, κυρίως φαρμακοκινητικής/φαρμακοδυναμικής φύσεως, που σχετίζονται με το σημείο της λοίμωξης και τη διείσδυση του φαρμάκου στον αντίστοιχο ιστό, τη νεφρική κάθαρση, την κατανομή του στον μη διαθέσιμο “τρίτο χώρο” και φυσικά, τη δοσολογία. Έχουν επίσης να κάνουν με τη φύση και τη σοβαρότητα της λοίμωξης καθώς και την παρουσία σηπτικού σοκ. Καθώς καμιά *in vitro* μέθοδος δεν μπορεί να σταθμίσει τέτοιους παράγοντες, φαίνεται επωφελέστερο να προσπαθήσει κανείς να συσχετίσει τα αποτελέσματα των *in vitro* μεθόδων ελέγχου συνέργειας με την κλινική έκβαση λοιμώξεων συγκρίσιμων ως προς το είδος και τη σοβαρότητα. Η ανάγκη κλινικών αποδείξεων, ικανών να επικυρώσουν τα αποτελέσματα *in vitro* μελετών έχει υπογραμμιστεί από αρκετούς ειδικούς την τελευταία δεκαετία (Tamma et al. 2012, Tangden et al. 2014b, Rossolini et al. 2014, Giacobbe et al. 2017).

Προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι παρά τον όγκο της *in vitro* μελέτης αντιμικροβιακών συνδυασμών, η υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν έχει πολλά να δείξει όσον αφορά στη συσχέτισή της με κλινικά αποτελέσματα. Υπάρχουν πολύ περιορισμένα στοιχεία, και σχεδόν τίποτε σε σχέση με συνδυασμούς έναντι πολυανθεκτικών εντεροβακτηριακών. Λεπτομερής βιβλιογραφική έρευνα ανέδειξε μόνον λίγες μικρές μελέτες παρατήρησης κλινικής και μικροβιολογικής έκβασης λοιμώξεων από *Acinetobacter* που αντιμετωπίστηκαν με συνδυασμούς οι οποίοι είχαν αποτιμηθεί *in vitro* (Lee et al. 2007, Bremmer et al. 2016), και μία που περιέλαβε και λοιμώξεις από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες (Nastro et al. 2014). Μια ακόμη μελέτη παρατήρησης, που παρουσίασε τη χρήση μιας παραλλαγής των κλασικών *in vitro* μεθόδων, που συνδυάζει προσδιορισμό βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσης συνδυασμών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, με χρήση πλάκας μικροτιλοδότησης αλλά και μέτρησης αποικιών για έλεγχο βακτηριοκτονίας (Multiple Combination Bactericidal Testing - MCBT) ως εργαλείο καθοδήγησης της θεραπείας, αναφέρει θετική ανταπόκριση των κλινικών γιατρών, αλλά χωρίς ομάδα ελέγχου ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα των θεραπειών με και χωρίς το εργαλείο αυτό (Cai et al. 2016).

Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχει καμία απόδειξη που να προέρχεται από ισχυρή πηγή, με τη μορφή τυχαιοποιημένης προοπτικής κλινικής μελέτης, που να συσχετίζει κλινικά αποτελέσματα με δεδομένα *in vitro* συνέργειας. Η μοναδική εξαίρεση που αξίζει να αναφερθεί, δεν αφορά καν πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά. Είναι το παράδειγμα της κυστικής ίνωσης.

Οι ασθενείς με κυστική ίνωση πάσχουν από πολυανθεκτικές λοιμώξεις ίσως περισσότερο από κάθε άλλον πληθυσμό ασθενών. Το γεγονός αυτό είχε οδηγήσει, μέχρι το 2009, το Cystic Fibrosis Foundation (πρωτοπόρος οργανισμός με στόχο τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης) να συστήνει τον έλεγχο *in vitro* συνέργειας αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων των ασθενών αυτών. Το 2005, ωστόσο, διεξήχθη μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη κλινική μελέτη με σκοπό να ερευνήσει την αποδοτικότητα και συνεπώς τη χρησιμότητα του ελέγχου για συνέργεια αντιβιοτικών για τους ασθενείς με κυστική ίνωση. Έτσι, ασθενείς σε έξαρση της ασθένειας και πνευμονική λοίμωξη έλαβαν έναν από δύο τύπους ενδοφλέβιας αντιμικροβιακής αγωγής, έναν βασισμένο στο συμβατικό τεστ ευαισθησίας και έναν καθοδηγημένο από έλεγχο συνέργειας. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η δεύτερη θεραπεία δεν ήταν πιο αποτελεσματική από την πρώτη (Aaron et al. 2005). Ο αντίκτυπος της μελέτης αυτής ήταν τέτοιος, ώστε το 2009, το Cystic Fibrosis Foundation απέσυρε τη σύσταση και εξέδωσε οδηγίες που αποτρέπουν από τον έλεγχο συνέργειας για τους ασθενείς αυτούς (Flume et al. 2009).

Η μελέτη αυτή παραμένει ως σήμερα η μοναδική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη (randomized controlled trial-RCT) που έχει γίνει με σκοπό τη διερεύνηση της κλινικής αποτελεσματικότητας του *in vitro* ελέγχου συνέργειας αντιβιοτικών. Σημειώνεται ότι η μελέτη αυτή αφορούσε συγκεκριμένη ομάδα ασθενών και μικροοργανισμών (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* και *Achromobacter xylosoxidans*). Αυτό σημαίνει πως δεν έχει υπάρξει καμία κλινική RCT ως τώρα αναφορικά με τον έλεγχο συνέργειας για εντεροβακτηριακά και ειδικότερα για *K. pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες, ικανή να δώσει ένα μέτρο της κλινικής αποτελεσματικότητάς του.

Τα κλινικά δεδομένα θα ρίξουν φως και σε ένα άλλο ζήτημα που ανακύπτει κατά τη μελέτη του ελέγχου *in vitro* συνέργειας αντιβιοτικών. Είναι πράγματι η Καμπύλη Θανατώσεως στο Χρόνο (Time Kill method) ανώτερη από τις άλλες υπάρχουσες

μεθόδους, όπως υποστηρίζουν αρκετοί συγγραφείς; Η πεποίθηση αυτή στηρίζεται κατά βάση στην ιδιότητα της μεθόδου να προσομοιώνει τις *in vivo* συνθήκες δράσης των αντιβιοτικών. Παρέχει πληροφορίες για το ρυθμό εξόντωσης του μικροοργανισμού και για τη βακτηριοκτόνο ικανότητα του συνδυασμού των αντιβιοτικών, ενώ οι υπόλοιπες μέθοδοι μπορούν μόνο να επισημάνουν την ανασταλτική, με άλλα λόγια, βακτηριοστατική, δράση του. Από κλινικής απόψεως, το ζήτημα «Κτόνο εναντίον Στατικού» εγείρει ορισμένους προβληματισμούς. Φαίνεται πως υπάρχουν αποδείξεις πως οι βακτηριοκτόνοι παράγοντες δεν είναι ανώτεροι των βακτηριοστατικών και πως άλλες παράμετροι, όπως η δοσολογία, φαρμακοκινητικές ιδιότητες και η διείσδυση στους ιστούς είναι πιο καθοριστικές για την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών ή των συνδυασμών τους (Wald-Dickler et al. 2018). Οι εκτιμήσεις αυτές θέτουν ερωτήματα σχετικά με την ακριβή κλινική σημασία της εν λόγω μεθόδου. Και πάλι, αυτό αποτελεί ζήτημα το οποίο καταλληλότερες να επιλύσουν είναι οι μελέτες που βασίζονται σε κλινικά αποτελέσματα.

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη δε βρήκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των διαφόρων εργαστηριακών μεθόδων ελέγχου συνέργειας που εξετάστηκαν για την εκτίμηση συνδυασμών της τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη έναντι στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση. Διαπιστώθηκε ανάγκη καλύτερης προτυποποίησης των σχετικών τεχνικών, καθώς και επικύρωσής τους από αξιόπιστα κλινικά δεδομένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από τις πιο ανησυχητικές μορφές αντιμικροβιακής αντοχής είναι η αντοχή στις καρβαπενέμες, κυρίως αυτή που παρατηρείται σε εντεροβακτηριακά, όπως σε στελέχη *K. pneumoniae*. Ο κύριος μηχανισμός της μορφής αυτής αντοχής είναι η παραγωγή καρβαπαπενεμασών, κυρίως των τάξεων A, B και D. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ιδιότητα να διασπείρονται εύκολα μέσω κινητών γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, με αποτέλεσμα να προκαλούν επιδημικές εξάρσεις, κυρίως ενδονοσοκομειακές, από στελέχη που τα φέρουν. Τα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν την παγκόσμια εξάπλωσή τους είναι ιδιαίτερα ανησυχητικά. Στη χώρα μας τα τελευταία επίσημα στοιχεία δείχνουν επιπολασμό διεισδυτικών στελεχών *K. pneumoniae* με αντοχή στις καρβαπενέμες που υπερβαίνει το 50%.

Δυστυχώς, η αντοχή δεν αφορά μόνον τις καρβαπενέμες, αλλά και σχεδόν όλες τις τάξεις αντιβιοτικών, εξαιτίας επιπρόσθετων μηχανισμών αντοχής που συνυπάρχουν στα στελέχη αυτά. Πολύ λίγα αντιβιοτικά διατηρούν, κατά περίπτωση, άλλοτε άλλη δραστηριότητα, όπως η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη, η γενταμικίνη και η φωσφομυκίνη, ενώ ακόμη και σε αυτά υπάρχουν αυξανόμενες αναφορές αντοχής. Οι νέοι συνδυασμοί κεφταζιδίμης/αβιμπακτάμης και μεροπενέμης/βαμπορμακτάμης είναι πολλά υποσχόμενοι, αλλά σαφής *in vivo* απόδειξη της χρησιμότητάς τους ακόμη δεν υπάρχει, ενώ είναι ανενεργοί για τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου MBL. Επιπλέον, υπάρχουν ήδη πρώιμες αναφορές αντοχής και σε αυτούς.

Οι δυσκολίες δε σταματούν εδώ. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες δυστυχώς επηρεάζουν κυρίως τους πιο εύάλωτους ασθενείς, αυτούς που είναι σοβαρά άρρωστοι, οξέως είτε χρονίως, ή φέρουν πολλαπλές συννοσηρότητες. Οι παράγοντες κινδύνου αρχικού αποικισμού τους και συνεπακόλουθης νόσησης έχουν πλήρως διερευνηθεί και όλοι σχετίζονται με επιβαρυνμένη υγεία, όπως νοσηλεία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, ανάγκη μηχανικού αερισμού, καθετήρων ή άλλων επεμβατικών διαδικασιών, σακχαρώδη διαβήτη, κακοήθεια, χημειοθεραπεία, προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών, κακή γενική κατάσταση και μακρά παραμονή στο νοσοκομείο. Τέτοιοι άρρωστοι χρήζουν άμεσης και αποτελεσματικής θεραπείας. Σε περίπτωση που νοσήσουν από τα εν λόγω στελέχη, τούτο γίνεται εξαιρετικά δυσχερές. Ως αποτέλεσμα, οι επακόλουθες λοιμώξεις, και κυρίως οι βακτηριαιμίες, σχετίζονται με πολύ ψηλή θνητότητα.

Η ενδεδειγμένη θεραπεία δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Παρ' ότι δεν υπάρχουν σθεναρές αποδείξεις που να προέρχονται από τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες (RCTs), υπάρχουν ωστόσο σημαντικά στοιχεία προερχόμενα από μεγάλες μελέτες παρατήρησης που συνηγορούν υπέρ της χρήσης συνδυασμού αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες, κυρίως σε σοβαρά ασθενείς με υψηλό ρίσκο θανάτου. Η αγωγή με συνδυασμό αντιβιοτικών προτιμάται από τους περισσότερους ειδικούς και εφαρμόζεται με την ελπίδα της επίτευξης ευνοϊκότερου θεραπευτικού αποτελέσματος από αυτό που θα αναμενόταν από τη χρήση ενός μόνο αντιβιοτικού.

Το αποτέλεσμα της δράσης συνδυασμού αντιβιοτικών μπορεί να είναι αθροιστικό, αδιάφορο ή και ανταγωνιστικό. Το ιδανικό είναι η συνεργική δράση, που σημαίνει ότι το τελικό αποτέλεσμα είναι ακόμη καλύτερο από το άθροισμα των δράσεων που έχει το καθένα απ' αυτά. Στην εποχή των ελάχιστων, ή ακόμη και ανύπαρκτων στις περιπτώσεις των παν-ανθεκτικών παθογόνων, θεραπευτικών επιλογών έναντι πολυανθεκτικών μικροοργανισμών, οι συνεργικοί αντιμικροβιακοί συνδυασμοί είναι σημαντικό βοήθημα για το λοιμωξιολόγο. Με δεδομένη τη συχνότητα χρήσης της συνδυαστικής θεραπείας και των προσδοκιών που εναποτίθενται σε αυτήν, μια εργαστηριακή μέθοδος ικανή να προβλέψει τη συνέργεια μεταξύ αντιβιοτικών θα ήταν πολύτιμη. Παρ' ότι δεν υπάρχει μια «gold standard» μέθοδος για τη μελέτη της συνέργειας, αυτές που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτερα στη βιβλιογραφία είναι η Καμπύλη Θανάτωσης στο Χρόνο (Time Kill Assay) και η Μέθοδος της Σκακιέρας (Checkerboard method), οι οποίες όμως εργώδεις, χρονοβόρες και ακατάλληλες για καθημερινή χρήση στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο. Θα ήταν χρήσιμο να βρεθεί μια μέθοδος το ίδιο αξιόπιστη, αλλά ταυτόχρονα και εφαρμόσιμη σε ένα κοινό μικροβιολογικό εργαστήριο.

Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα εργασία μελέτησε συνδυασμούς αντιβιοτικών που αποτελούν μερικές από τις τελευταίες θεραπευτικές επιλογές έναντι κλινικών στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες διαφόρων τύπων, και συγκεκριμένα της τιγκεκυκλίνης με είτε κολιστίνη, γενταμικίνη, φωσφομυκίνη ή μεροπενέμη, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της Καμπύλης Θανάτωσης στο Χρόνο, της Σκακιέρας και τρεις μεθόδους βασισμένες στη χρήση των Etest, προκειμένου να βρεθεί εάν κάποια από τις τελευταίες, που αποτελούν πολύ ευκολότερες και πρακτικά εφικτές διαδικασίες, μπορεί να αντικαταστήσει τις πρώτες. Προς τούτο, η Καμπύλη

Θανάτωσης στο Χρόνο χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς, καθώς αρκετοί συγγραφείς θεωρούν πως παρέχει τις χρησιμότερες κλινικά πληροφορίες, αλλά και επειδή παραμένει η μοναδική πιστοποιημένη προς χρήση για το σκοπό αυτό εργαστηριακή μέθοδος.

Με βάση τη μέθοδο αναφοράς, βρέθηκε συνέργεια στο 11% των συνδυασμών που μελετήθηκαν. Περισσότερο συνεργικός ήταν ο συνδυασμός της τιγκεκυκλίνης με την κολιστίνη, σε ποσοστό 25%. Ακολούθησε ο συνδυασμός με γενταμικίνη σε ποσοστό 10%, με μεροπενέμη 8% και με φωσφομυκίνη 4.5%. Η μέθοδος της σκακιέρας έδωσε συνολικό ποσοστό συνέργειας 26.5% και οι μεθοδολογίες των Etest από 47% ως 2%. Το τελευταίο, και περισσότερο «αυστηρό» αποτέλεσμα έδωσε η μεθοδολογία Etest του «σταυρού». Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που μπορεί να βρει κανείς ανατρέχοντας σε παρόμοιες δημοσιευμένες μελέτες συνδυασμών τιγκεκυκλίνης έναντι στελεχών *K.pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες, στις οποίες συχνό εύρημα αποτελεί η διαπίστωση συνέργειας μεταξύ τιγκεκυκλίνης και κολιστίνης, ενώ υπάρχουν σποραδικά ευρήματα συνεργείας και με μεροπενέμη, γενταμικίνη ή φωσφομυκίνη.

Μελετώντας το βαθμό συμφωνίας των υπολοίπων μεθόδων με τη μέθοδο αναφοράς ΚΘΧ, παρ' ότι υπήρξαν σημαντικά ποσοστά παρατηρηθείσας συμφωνίας, από 50% ως 85%, αυτή φάνηκε να είναι στατιστικά πρακτικά ασήμαντη, με τη χρήση του συντελεστή ομοφωνίας Cohen's kappa (κ). Με βάση αυτόν, ο οποίος συνυπολογίζει την πιθανότητα της συμφωνίας από τύχη, καθώς συνέργεια διαπιστωνόταν αραιά έως σπάνια, η συμφωνία όλων των υπολοίπων μεθόδων με τη μέθοδο αναφοράς ήταν πτωχή. Η μοναδική επί μέρους περίπτωση όπου βρέθηκε καλή στατιστική συμφωνία με τη μέθοδο αναφοράς ήταν η μέθοδος Etest σχηματισμού σταυρού για το συνδυασμό τιγκεκυκλίνης/φωσφομυκίνης. Κάπως καλύτερη («κάποια») ήταν η στατιστική συμφωνία μεταξύ δύο από τις μεθοδολογίες Etest (MIC/MIC ratio και Άγαρ/Etest) με τη μέθοδο της σκακιέρας. Ανατρέχοντας και πάλι στη βιβλιογραφία, σε παρόμοιες μελέτες που ανακοίνωσαν βαθμό συμφωνίας μεθόδων όπως της παρούσας, αναφορικά με διάφορους gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, διαπιστώθηκε η μεγαλύτερη δυνατή ανομοιομορφία αποτελεσμάτων που ήταν δυνατό να βρεθεί, με αναφερόμενη συμφωνία από 0-100%.

Εμβαθύνοντας στα αίτια της ασυμφωνίας των μεθόδων μας, καθώς και της εντυπωσιακής ποικιλότητας των βιβλιογραφικών δεδομένων, διαπιστώθηκε μια πλειάδα από πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη φύση της κάθε μεθόδου και που καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση των παραγομένων αποτελεσμάτων. Πρωτίστως, η ΚΘΧ μελετά το ρυθμό εξόντωσης ενώ οι υπόλοιπες την αναστολή ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού, που αποτελούν διαφορετικά μεγέθη. Η πρώτη μελετά πώς δρουν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, οι άλλες μετρούν Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC). Τα παρόντα ευρήματα πιθανότατα αντανakλούν αυτές τις διαφορές μεταξύ ΚΘΧ και των υπολοίπων μεθόδων (και συνακολούθως των ομοιοτήτων σκακιάρας/Etest), καθώς δείχνουν ασυμφωνία μεταξύ της πρώτης και των τελευταίων, ενώ αντίθετα φανερώνουν κάποια συμφωνία μεταξύ των δύο από τις τρεις μεθοδολογίες Etest που δοκιμάστηκαν και της σκακιάρας.

Σε σχέση με τις μεγάλες διαφορές μεθοδολογικής συμφωνίας που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία πρέπει να ληφθεί ακόμη υπόψη πως οι παράμετροι που αξιολογεί ο κάθε ερευνητής μπορεί να ποικίλλουν, όπως για παράδειγμα η εκδήλωση συνέργειας σε ώρες άλλες από τις 24, καθώς και η εκδήλωση αθροιστικής, εκτός από συνεργική, δράσης. Άγνωστη επίσης είναι η επίδραση διαφορών στις δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, καθώς και στα μικροβιακά στελέχη που μπορεί να χρησιμοποιηθούν, καθώς μπορεί τούτα να είναι ευαίσθητα ή ανθεκτικά στα δοκιμαζόμενα αντιβιοτικά, και με άλλοτε άλλα ερμηνευτικά κριτήρια ευαισθησίας.

Συμπεραίνει εύλογα κανείς ότι απαιτείται βελτιστοποίηση και προτυποποίηση των υπαρχόντων τεχνικών. Ωστόσο, και με την απουσία αληθούς «gold standard» για τη μελέτη της συνέργειας, είναι δύσκολο να αποφανθεί κανείς για την αξιοπιστία κάποιας από αυτές. Ο μόνος ασφαλής τρόπος για να γίνει αυτό είναι μέσω της συσχέτισης των αποτελεσμάτων τους με κλινικά στοιχεία, δηλαδή με την απόδειξη της κλινικής αποτελεσματικότητας ενός υποτιθέμενου, βάσει μιας ορισμένης μεθόδου, συνεργικού συνδυασμού. Τέτοιων αποδείξεων, με τη μορφή αποτελεσμάτων τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών μελετών, η βιβλιογραφία στερείται σχεδόν παντελώς. Η ανάγκη διεξαγωγής τέτοιων μελετών φαίνεται επιτακτική και στο χώρο της αναζήτησης συνέργειας αντιβιοτικών.

SUMMARY

Carbapenem resistant *K. pneumoniae* admittedly represents a contemporary public health threat. This form of resistance is primarily caused by class A, B or D carbapenemases. These enzymes are highly transmissible via mobile genetic elements such as plasmids, and therefore manifest a high potential to cause outbreaks, particularly across health care facilities. Their global prevalence has consequently reached alarming rates. In Greece, carbapenem resistant *K. pneumoniae* prevalence has exceeded 50%, according to recent data. Unfortunately, resistance does not only affect carbapenems and subsequently virtually all β -lactams, but because of additional resistance mechanisms that are co-carried by these isolates, it expands to many other antibiotic classes. Very few antibiotics remain variably active, such as colistin, tigecycline, gentamycin and fosfomycin and even these seem to suffer a decreasing level of effectiveness, as resistance is reported at a growing rate. The recently implemented combinations of ceftazidime/avibactam and meropenem/vaborbactam seem to constitute promising options, but clear *in vivo* evidence is lacking and early resistance reports are of concern, while they are inactive against class B carbapenemases.

Misfortunes do not end here. Infections caused by carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates primarily affect vulnerable patients severely ill, either chronically or acutely, or else debilitated with multiple comorbidities. Risk factors for initial colonization and subsequent infection from CRKP have been well established by multiple researchers and are all associated with compromised states of health, namely admission in Intensive Care Units, need of mechanical ventilation, use of central catheters or other invasive procedures, diabetes mellitus, malignancy, chemotherapy, prior multiple antibiotic use, poor functional status and extended length of hospital stay. Given their critical condition, treatment should be prompt and highly effective. Instead, it is compromised by the limited therapeutic options. Hence, very high mortality ensues, resulting primarily from bacteraemias due to said isolates.

Despite the ongoing battle of clinicians against such infections, there has been no consensus as to which is the indicated treatment strategy. Even though high quality evidence, in the form of randomized control trials, is lacking, there is data derived

from several large scale retrospective studies which clearly supports combination therapy for these infections, claiming an association with lower mortality, particularly for patients at a high risk of death. Combination therapy seems to be the preferred approach by most experts, in the hope of achieving a result more favorable than the one expected by monotherapy.

Combined antimicrobials might act additively, indifferently or even antagonistically to one another. The best scenario is for them to act synergistically, generating an effect greater than the sum of their individual activities. In the era of limited or even absent therapeutic options, a synergistic antimicrobial combination might prove important for the clinician. Given the frequency at which combination therapy is employed for the treatment of resistant infections, as well as the expectations clinicians have placed upon it, a reliable and accurate method able to predict the efficacy of a specific combination would be invaluable. Although there is no definite gold standard synergy testing method, the two most common ones through literature are the Time Kill and the Checkerboard methods, neither of which is available for routine use in the clinical microbiology laboratory, due to their laborious nature. A method as reliable, but also easily performed in any laboratory, would be expedient, in that it would permit routine combination testing against strains isolated from patients.

In this context, this study assessed dual combinations of some of the last resort drugs against *K. pneumoniae* isolates producing carbapenemases of various stypes, namely combinations of tigecycline with either colistin, gentamicin, fosfomycin or meropenem. The Time Kill and Checkerboard methods were employed, along with three different Etest methodologies, in order to determine whether one of the latter - much easier and simpler to perform - might prove suitable to replace the former. To that end, the Time Kill was used as a reference method, being considered by many to provide the most useful information from a clinical point of view, while it remains the sole standardised method for laboratory synergy testing.

According to the reference method, synergy was found for 11% of all combinations tested. The most synergistic one was that of tigecycline and colistin at a rate of 25%, followed by the one with gentamicin at 10%, meropenem at 8% and fosfomycin at 4.5%. These findings are in line with published research data on the activity of

tigecycline in combination with other agents against carbapenem resistant *K. pneumoniae*, which show that when combined with colistin, tigecycline is significantly more effective than either agent alone in Time-Kill assays. This combination has also demonstrated a synergistic effect with the checkerboard method, which in this study reached 45%. There also exist sporadic synergy reports with fosfomycin and gentamicin, as also noted in the present study. In the latter, the checkerboard method produced in total a higher synergy rate of 26.5%, while the Etest methods rates ranged from 2 to 47%. The “strictest” result was generated by the Cross Formation Etest method.

The ultimate goal of the present study was to determine the degree of concordance between the reference and possible alternative methods. Despite the considerable rates of observed agreement between TKA and the rest of the methods tested, which ranged from 50% to 85%, analysis by Cohen’s kappa statistics revealed an almost nonexistent statistical correlation between them. There was one solitary exception, that of perfect statistical agreement between the reference and the cross formation Etest method for the combination of tigecycline with fosfomycin. Exploring correlations further than the Time Kill, there was only a fair agreement between two of the Etest methods with the checkerboard method.

Looking at published studies comparing synergy testing methods against a variety of resistant gram-negative microorganisms, one can find rates of concordance which vary greatly, from 0% to 100%, which in fact represents the highest possible variability. This is not surprising if a number of parameters adhering to the nature of each method is to be considered. Most importantly, the methods involved bear different endpoints. Thus, the Time Kill assay measures the rate of bacterial killing, whereas the checkerboard and Etest methods, the inhibition of bacterial growth. Furthermore, the Time Kill evaluates killing over time, while the rest determine results at a fixed time point. It also uses specific agent concentrations, unchanged throughout the assay, whereas the rest assess optimal inhibition concentrations of the agents tested. The present study might indeed reflect these differences between the Time Kill and Checkerboard/Etest methods, as it yielded poor agreement between the former and the latter, but detected a fair one between the two out of three Etest methods and the checkerboard.

Further insight into the comparability of synergy testing methods reveals additional confounding factors, such as reproducibility issues, particularly for the checkerboard technique. On another note, each researcher may or may not evaluate parameters such as synergy at time points other than the 24 hours for the time kill assay, or the expression of additive, alongside synergistic, actions. Finally, there is an infinite variety of combinations of different drug concentrations acting on strains of different qualities, such as resistance or sensitivity to the former, and with individual resistance mechanisms.

Such considerations imply that there is a need for optimization and standardization of *in vitro* combination studies. Still, and in light of the absence of a true gold standard for synergy, it would be difficult to discern which of these methods provides the most reliable and accurate results. The optimal way to find out would be to correlate their findings with clinical outcomes, so as to obtain clinical evidence to support their validity. Such validation, in the form of randomised controlled trials, is almost nonexistent throughout current literature. It seems that outcome-based studies are urgently needed so as to throw light on the matter of antimicrobial synergy testing.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CRE: Carbapenem resistant Enterobacteriaceae

CPE: Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*

CPKp: Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

KPCKp: *K.pneumoniae* Carbapenemase *K.pneumoniae*

MBLKp: MBL type Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

VIMKp: VIM type Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

NDMKp: NDM type Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

OXAKp: OXA type Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

TKA: Time Kill Assay

CB: Checkerboard

CF: Cross Formation method

MIC: Minimal Inhibitory Concentration

ΚΘΧ: Καμπύλη Θανάτωσης στο Χρόνο

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Κάθε βιβλιογραφική παραπομπή σημειώνεται στο κείμενο με το όνομα του πρώτου συγγραφέως (αν πρόκειται για δημοσιευμένο άρθρο) και το έτος δημοσίευσης. Σε περίπτωση που ο ίδιος συγγραφέας έχει δημοσιεύσει και άλλη εργασία του το ίδιο έτος, τότε χρησιμοποιούνται επισημάνσεις (a, b, c κοκ) για κάθε μία από αυτές.

Παραπομπές σε διεθνείς οργανισμούς σημειώνονται με τα διεθνώς αναγνωρισμένα αρχικά της ονομασίας του οργανισμού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

AAC 2006: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006 Instructions to Authors.

<https://aac.asm.org/content/50/1/1>

Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, Fergusson D, Tullis E, Haase D, Berthiaume Y, Brown N, Wilcox P, Yozghatlian V, Bye P, Bell S, Chan F, Rose B, Jeanneret A, Stephenson A, Noseworthy M, Freitag A, Paterson N, Doucette S, Harbour C, Ruel M, MacDonald N. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, doubleblind, controlled clinical trial. *Lancet*. 2005; 366:463-471.

Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Landman D, Ghitan M, Collins B, Bratu S, Quale J. Rise and fall of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:2945-8.

Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE, Paterson DL, Doi Y. Activity of temocillin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2700-2701.

Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* working g. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 2015; 20:piiD30062.

Albur M, Noel A, Bowker K, MacGowan A. Bactericidal activity of multiple combinations of tigecycline and colistin against NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3441-3.

Ambler, R. P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321-331.

Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, p. 53–105. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed. 1991. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Ariza J, Corredoira J, Pallares R, et al. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1241-1249.

Aubron C, Poirel L, Ash JR, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 260-264.

Barbour A, Schmidt S, Ma B, Schiefelbein L, Rand KH, Burkhardt O, Derendorf H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tigecycline. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48:575-84.

Barth N, Ribeiro VB, Zavascki AP. In vitro activity of polymyxin B plus imipenem, meropenem, or tigecycline against KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* with high MICs for these antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:3596-7.

Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G, De Rosa FG, Giamarellos-Bourboulis EJ, Rossolini GM, Righi E, Karaiskos I, Tumbarello M, Nicolau DP, Viale PL, Poulakou G; Critically Ill Patients Study Group of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID); Hellenic Society of Chemotherapy (HSC) and Società Italiana di Terapia Antinfettiva (SITA). Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:133-144.

Bejuk D, Novkoski M, Juranko V et al. A report of rarely observed resistance pattern to carbapenems in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Lijec Vjesn* 2013; 135: 316-321.

Ben-David D et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect*. 2012;18:54-60.

Berçot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. In vitro evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:2295-7.

Betts JW, Phee LM, Hornsey M, Woodford N, Wareham DW. In vitro and in vivo activities of tigecycline-colistin combination therapies against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:3541–3546.

Binder L, Schwörer H, Hoppe S, Streit F, Neumann S, Beckmann A, Wachter R, Oellerich M, Walson PD. Pharmacokinetics of meropenem in critically ill patients with severe infections. *Ther Drug Monit.* 2013; 35:63-70.

Bogdanovich T, Adams-Haduch JM, Tian GB, et al. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin Infect Dis.* 2011; 53:373-376.

Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: A comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38:43-50.

Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44: 363-6.

Boo TW, O'Connell N, Power L et al. First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland, March 2013. *Euro Surveill* 2013; 18: Pii 20548.

Borah VV, Saikia KK, Chandra P, Hazarika NK, Chakravarty R. New Delhi metallo-beta-lactamase and extended spectrum beta-lactamases co-producing isolates are high in community-acquired urinary infections in Assam as detected by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. *Indian J Med Microbiol* 2016; 34:173-82.

Borer A, et al. 2009. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30:972-976.

Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, Nativ R, Riesenberk K, Livshiz-Riven I, Schlaeffer F, Sherf M, Peled N. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. *Am J Infect Control.* 2012;40:421-5.

Boucher HW, Talbot GH, Benjamin BDK Jr, et al. 10 x '20 progress— development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2013; 56:1685-1694.

Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin Infect Dis.2004;39:55-60.

Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. J Antimicrob Chemother. 2005;56:128-32.

Bremmer DN, Bauer KA, Pouch SM, Thomas K, Smith D, Goff DA, Pancholi P, Balada-Llasat JM. Correlation of Checkerboard Synergy Testing with Time-Kill Analysis and Clinical Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Respiratory Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:6892-6895.

Bush K, Fisher J. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol 2011; 65:455–78.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 969-76.

Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 62. pii: e01076-18.

Cai Y, Wang R, Liang B, Bai N, Liu Y. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness and safety of tigecycline for treatment of infectious disease. Antimicrob Agents Chemother. 2011 ;55:1162-72.

Cai Y, Chua NG, Lim TP, Teo JQ, Lee W, Kurup A, Koh TH, Tan TT, Kwa AL. From Bench-Top to Bedside: A Prospective In Vitro Antibiotic Combination Testing (iACT) Service to Guide the Selection of Rationally Optimized Antimicrobial Combinations against Extensively Drug Resistant (XDR) Gram Negative Bacteria (GNB). PLoS One. 2016;11:e0158740.

Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet 2010; 44: 141-66.

Cano A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Gracia-Ahufinger I, Pérez-Nadales E, Causse M, Castón JJ, Guzman-Puche J, Torre-Giménez J, Kindelán L, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Torre-Cisneros J. Risks of Infection and Mortality Among Patients Colonized With *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Validation of Scores and Proposal for Management. Clin Infect Dis. 2018; 66:1204-1210.

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012;18: 413-31.

Cappelletty, D. M., Rybak, M. J. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40: 677-683.

Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. Clin Microbiol Infect 2010; 16:102-11.

Carrara E, Bragantini D, Tacconelli E. Combination versus monotherapy for the treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Curr Opin Infect Dis. 2018;31:594-599.

Castanheira M, Mills JC, Costello SE, Jones RN, Sader HS. Ceftazidime-avibactam activity tested against *Enterobacteriaceae* isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of β -lactamase-producing strains. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59:3509e17.

Castanheira M., Deshpande L. M., Dipersio J. R., Kang J., Weinstein M. P., Jones R. N. First descriptions of blaKPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. J. Clin. Microbiol 2009; 47: 4129-30.

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

Indian hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 1274-78.

Caston JJ, Lacort-Peralta I, Martin-Davila P, et al. Clinical efficacy of ceftazidime/avibactam versus other active agents for the treatment of bacteremia due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hematologic patients. *Int J Infect Dis* 2017; 59:118–123.

CDCa: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic/Antimicrobial Resistance /Biggest Threats and Data. Διαθέσιμο από: http://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html

CDCb: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62:165-70.

CDCc: Centers for Disease Control and Prevention. Tracking CRE. 2016. Διαθέσιμο από: <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html>

Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, Wang H. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2493-4.

Choi MJ, Ko KS. Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:275-7.

Chouchani C, Marrakchi R, Henriques I, Correia A. Occurrence of IMP-8, IMP-10, and IMP-13 metallo-beta-lactamases located on class 1 integrons and other extended-spectrum beta-lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers. *Scand J Infect Dis* 2013; 45:95-103.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; approved standard - tenth edition. Wayne, PA: CLSI; 2015 CLSI document M07-A10.

Cobo J, Morosini MI, Pintado V, Tato M, Samaranch N, Baquero F et al. Use of tigecycline for the treatment of prolonged bacteremia due to a multiresistant VIM-1 and SHV-12 beta--lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60: 319-22.

Cojutti P1, Sartor A, Righi E, Scarparo C, Bassetti M, Pea F. Population Pharmacokinetics of High-Dose Continuous-Infusion Meropenem and Considerations for Use in the Treatment of Infections Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61. pii: e00794-17.

Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-b-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1119-25.

Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42:59-62.

Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 1393-1404.

Daikos GL, Petrikkos P, Psychogiou M, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1868-73.

Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2322-2328.

Darley E., Weeks J., Jones L., Daniels V., Wootton M., Macgowan A., et al. NDM-1 polymicrobial infections including *Vibrio cholerae*. *Lancet* 2012; 380: 1358.

Dawis MA, Isenberg HD, France KA, Jenkins SG. *In vitro* activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. *Antimicrob Chemother*. 2003;51:1203-11.

[Del Bono V](#), [Giacobbe DR](#), [Marchese A](#), [Parisini A](#), [Fucile C](#), [Coppo E](#), et al. Meropenem for treating KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: should we get to the PK/PD root of the paradox? *Virulence* 2017; 8:66-73.

[Doern CD](#). When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 4124-8.

[Doi Y](#), [O'Hara JA](#), [Lando JF](#) et al. Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 163-165.

[ECDCa](#): European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* - first update 2018. Διαθέσιμο από: <http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-first-update>

[ECDCb](#): European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018. Διαθέσιμο από: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>

[Elemam A](#), [Rahimian J](#), [Doymaz M](#). In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3558-62.

[Eliopoulos GM](#), [Eliopoulos CT](#). Antibiotic combinations: should they be tested?. *Clin Microbiol Rev*. 1988;1:139-56.

[EMA](#): European Medicines Agency. Zavicefta: summary of product characteristics. 2018. <https://www.ema.europa.eu>

[Endimiani A](#), [Carias LL](#), [Hujer AM](#), [Bethel CR](#), [Hujer KM](#), [Perez F](#), [Hutton RA](#), [Fox WR](#), [Hall GS](#), [Jacobs MR](#), [Paterson DL](#), [Rice LB](#), [Jenkins SG](#), [Tenover FC](#), [Bonomo RA](#). Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing bla_{KPC} in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2680-2.

[Endimiani A](#), Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. *In vitro* activity of fosfomicin against *bla*_{KPC}-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:526-9.

[Endimiani A.](#), Carias L. L., Hujer A. M., Bethel C. R., Hujer K. M., Perez F., et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *bla*_{KPC} in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008; 52: 2680-82.

[EUCAST a](#): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1. 2018 <http://www.eucast.org> [Προβλήθηκε: Σεπτέμβριος 2018].

[EUCAST b](#): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0. Växjö: EUCAST; 2017. Διαθέσιμο από: <http://www.eucast.org>

[EUCAST c](#): EUCAST. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. http://www.eucast.org/guidance_documents/

[Falagas 2014a](#): Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1170-5

[Falagas 2014b](#): Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother.*2014; 58:654-63.

[Falagas ME](#), Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:240-3.

FDA. 1 September 2010, posting date. FDA drug safety communication: increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm>

FDA. 27 September 2013, posting date. Drug Safety Communication: FDA warns of increased risk of death with IV antibacterial Tygacil (tigecycline) and approves new Boxed Warning. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm369580.htm>

FDA: Avycaz (ceftazidime and avibactam) for injection, for intravenous use: US prescribing information. 2018. <https://www.accessdata.fda.gov>

Flume PA, Mogayzel PJ Jr, Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL, Kuhn RJ, Marshall BC, Clinical Practice Guidelines for Pulmonary Therapies Committee. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2009;180:802-808.

Foweraker JE, Laughton CR, Brown DF, Bilton D. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:4809-15.

Fraenkel-Wandel Y, Raveh-Brawer D, Wiener-Well Y, Yinnon AM, Assous MV. Mortality due to *bla*_{KPC} *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71:1083-7.

Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1856-65.

Galani I, Karaiskos I, Karantani I, Papoutsaki V, Maraki S, Papaioannou V, Kazila P, Tsorlini H, Charalampaki N, Toutouza M, Vagiakou H, Pappas K, Kyratsa A, Kontopoulou K, Legga O, Petinaki E, Papadogeorgaki H, Chinou E, Souli M, Giamarellou H, On Behalf Of The Study Collaborators. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23(31).

Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:1184-86.

Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control study. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:1106.e1-8.

Giacobbe DR, Maraolo AE, Viscoli C. Pitfalls of defining combination therapy for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in observational studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:1707-1709.

Giakkoupi P, Maltezou HC, Polemis M et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperendemic clone. *Euro Surveill* 2009; 14: pii:19218.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1510-3.

Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Kontopidou F, Tsonou P, Golegou T, Souki H, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77:382-4.

Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3893-6.

Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? *Drugs* 2009; 69:1879-901

Giamarellou H, Poulakou G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of tigecycline. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7:1459-70.

Giannella M, Trecarichi EM, De Rosa FG, Del Bono V, Bassetti M, Lewis RE, Losito AR, Corcione S, Saffioti C, Bartoletti M, Maiuro G, Cardellino CS, Tedeschi S, Cauda R, Viscoli C, Viale P, Tumbarello M. Risk factors for carbapenem-resistant

Klebsiella pneumoniae bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. Clin Microbiol Infect. 2014;20:1357-62.

Giannella M, Trecarichi EM, Giacobbe DR, De Rosa FG, Bassetti M, Bartoloni A, Bartoletti M, Losito AR, Del Bono V, Corcione S, Tedeschi S, Raffaelli F, Saffioti C, Spanu T, Rossolini GM, Marchese A, Ambretti S, Cauda R, Viscoli C, Lewis RE, Viale P, Tumbarello M; Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva (ISGRI-SITA). Effect of combination therapy containing a high-dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. Int J Antimicrob Agents. 2018;51:244-248.

Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Dec;54:5316-22.

Grabein B, Graninger W, Rodriguez Bano J, et al. Intravenous fosfomycin-back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature. Clin Microbiol Infect 2017; 23:363-372.

Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2006;19:155-61.

Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. Lancet Infect Dis. 2017;17:153–63.

Gülmez D., Woodford N., Palepou M.-F. I., Mushtaq S., Metan G., Yakupogullari Y., et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. Int. J. Antimicrob. Agents 2008; 31: 523-26.

Gutierrez-Gutierrez B, Salamanca E, de Cueto M, Hsueh PR, Viale P, Paño-Pardo JR, et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (INCREMENT): a retrospective cohort study. Lancet Infect Dis 2017; 17:726-34.

Hauck C, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, Kalayjian RC, Watkins RR, Scalera NM, Doi Y, Kaye KS, Evans S, Fowler VG Jr, Bonomo RA, van Duin D; Antibacterial Resistance Leadership Group. Spectrum of excess mortality due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. Clin Microbiol Infect. 2016; 22:513-9.

Hawkey PM, Warren RE, Livermore DM, McNulty CAM, Enoch DA, Otter JA, Wilson APR. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. J Antimicrob Chemother. 2018;73:iii2-iii78.

Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 2321-4.

Hirsch EB, Guo B, Chang KT, Cao H, Ledesma KR, Singh M, Tam VH. Assessment of antimicrobial combinations for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. J Infect Dis. 2013 Mar 1;207(5):786-93.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1119-25.

Hunter, T. H. Use of streptomycin in the treatment of bacterial endocarditis. Am. J. Med. 1947; 2: 436-442.

Hussein K, Raz-Pasteur A, Finkelstein R, et al. Impact of carbapenem resistance on the outcome of patients' hospital-acquired bacteraemia caused by *Klebsiella pneumoniae*. J Hosp Infect 2013; 83:307-13.

IMI: Innovative Medicines Initiative. <https://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/nd4bb>

Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 824-9.

[Karageorgopoulos](#) 2012a: Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH, Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:255-68.

[Karageorgopoulos](#) 2012b: Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouveleki LS, Spyridopoulou K, Daikos GL. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2777-9.

[Karaiskos](#) I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. Novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2019;15:133-149.

[Karaiskos](#) I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014; 15:1351-1370.

[Karaiskos](#) I, Souli M, Galani I, Giamarellou H. Colistin: still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13:59-71.

[Karampatakis](#) T, Antachopoulos C, Iosifidis E, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiol.* 2016;11: 809-23.

[Kashuba](#) AD, Nafziger AN, Drusano GL, Bertino JS Jr. Optimizing Aminoglycoside Therapy for Nosocomial Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 623–629.

[Kaye](#) KS, Vazquez J, Mathers A, et al. Meropenem/vaborbactam (Vabomere) vs. best available therapy for CRE infections: TANGO II randomized, controlled phase 3 study results. [abstract 1862]. Poster presented at: ID Week 2017; 2017 Oct 4 – 8; San Diego, CA.

[Kazi](#) M, Drego L, Nikam C, Ajbani K, Soman R, Shetty A, Rodrigues C. Molecular characterization of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* at a tertiary care laboratory in Mumbai. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34:467-72.

[Kazmierczak KM](#), de Jonge BLM, Stone GG, et al. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against isolates of *Enterobacteriaceae* collected in European countries: INFORM global surveillance 2012-15. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:2782-2788.

[Kitchel B.](#), Rasheed J. K., Endimiani A., Hujer A. M., Anderson K. F., Bonomo R. A., et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010; 54: 4201-07.

[Kitchel B.](#), Rasheed J. K., Patel J. B., Srinivasan A., Navon-Venezia S., Carmeli Y., et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother* 2009; 53: 3365-70.

[Kontopoulou K](#), Protonotariou E, Vasilakos K, et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect.* 2010; 76:70-73.

[Kumarasamy KK](#), Toleman MA, Walsh TR et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597-602.

Lahey database: <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#>

[Le J](#), McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* 2011;3:106-10.

[Lee GC](#), Burgess DS. Polymyxins and Doripenem Combination Against KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res.* 2013;5:97-100.

[Lee GC](#), Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:32.

[Lee NY](#), Wang CL, Chuang YC, Yu WL, Lee HC, Chang CM, et al. Combination carbapenem-sulbactam therapy for critically ill patients with multidrug-resistant

Acinetobacter baumannii bacteremia: Four case reports and an *in vitro* combination synergy study. *Pharmacotherapy* 2007; 27:1506-11.

Lerner A, Solter E, Rachi E, Adler A, Rechnitzer H, Miron D, Krupnick L, Sela S, Aga E, Ziv Y, et al. Detection and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in wounded Syrian patients admitted to hospitals in northern Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35:149-54.

Levin S, Harris AA. Principles of combination therapy. *Bull N Y Acad Med.* 1975;51:1020-38.

Li H, Estabrook M, Jacoby GA, Nichols WW, Testa RT, Bush K. *In vitro* susceptibility of characterized β -lactamase-producing strains tested with avibactam combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59: 1789e93.

Livermore D. M., Walsh T. R., Toleman M., Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect. Dis* 2011; 11: 164.

Livermore DM, et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011; 37: 415- 419.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:161-8.

Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017 ; 215(suppl_1):S28-S36.

Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsivkovski R, Griffith DC, Dudley MN. Vaborbactam: spectrum of β -lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e01443-17.

[Machuca I](#), Gutiérrez-Gutiérrez B, Gracia-Ahufinger I, et al. Mortality associated with bacteremia due to colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* with high-level meropenem resistance: importance of combination therapy without colistin and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: pii:e00406–17.

[Magiorakos AP](#), Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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;18:268-81.

[Maltezou HC](#), Giakkoupi P, Maragos A, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect.* 2009; 58:213-19.

[Maltezou HC](#), Kontopidou F, Dedoukou X, Katerelos P, Gourgoulis GM, Tsonou P, et al. Action Plan to combat infections due to carbapenem-resistant, Gram-negative pathogens in acute-care hospitals in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014; 2:11-6.

[Mamina C](#), Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, Saporito MA, Verde MS, Tetamo R, Palma DM. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.* 2012; 17: pii: 20248.

[Manno G](#), Ugolotti E, Belli ML, Fenu ML, Romano L, Cruciani M. Use of the E test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:28-34.

[Maraki S](#), Papadakis IS. Evaluation of antimicrobial combinations against colistin-resistant carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Chemother.* 2015;27:348-52.

[Marchaim D](#), Chopra T, Pogue JM, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:593-599.

[Marchaim D](#), Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular

characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1413-18.

[Markou N](#), Markantonis SL, Dimitrakis E, Panidis D, Boutzouka E, Karatzas S, Rafailidis P, Apostolakos H, Baltopoulos G. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: a prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin Ther.* 2008;30:143-51.

[Martin A](#), Fahrbach K, Zhao Q, Lodise T. Association Between Carbapenem Resistance and Mortality Among Adult, Hospitalized Patients With Serious Infections Due to *Enterobacteriaceae*: Results of a Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5: ofy150.

[Matuschek E](#), Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24: 865-870.

[Medeiros GS](#), Rigatto MH, Falci DR, Zavascki AP. Combination therapy with polymyxin B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53:152-157.

[Meletis G](#), Oustas E, Botziori C, Kakasi E, Koteli A. Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol.* 2015; 38:417-21.

[Michail G](#), Labrou M, Pitiriga V, Manousaka S, Sakellaridis N, Tsakris A, Pournaras S. Activity of Tigecycline in combination with Colistin, Meropenem, Rifampin, or Gentamicin against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:6028-33.

[Michalopoulos A](#), Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:184-6.

Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC, Piperaki E, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the blaVIM-1-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 540–541.

Moland ES, Hong SG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:800-1.

Motos A, Avery LM, DeRonde KJ, Mullane EM, Kuti JL, Nicolau DP. Where should antibiotic gradient diffusion strips be crossed to assess synergy? A comparison of the standard method with a novel method using steady-state antimicrobial concentrations. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53:698-702.

Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, et al. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase/ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:1250-6.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 785-796.

Naas T, Cattoen C, Bernusset S, Cuzon G, Nordmann P. First identification of bla_{IMI-1} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1664–1665.

Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 7693-7.

Nastro M, Rodríguez CH, Monge R, Zintgraff J, Neira L, Rebollo M, et al. Activity of the colistin–rifampicin combination against colistin-resistant, carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Chemother* 2014; 26:211-16.

Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Plasmid mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3098–101.

NCCLS. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. Document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Neuner EA, Yeh JY, Hall GS et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 357-62.

Ni W, Shao X, Di X, Cui J, Wang R, Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:8-18.

Ni W, Han Y, Liu J, Wei C, Zhao J, Cui J, Wang R, Liu Y. Tigecycline Treatment for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e3126.

Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2850-8.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:228-36.

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

Nordmann 2011a: Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011; 19: 588-95.

Nordmann 2011b: Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791-98.

Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20:821-30.

Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014; 44: 51-6.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 1.

Oliva A, Scorzolini L, Cipolla A, Mascellino MT, Cancelli F, Castaldi D et al. In vitro evaluation of different antimicrobial combinations against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the activity of the double-carbapenem regimen is related to meropenem MIC value. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 1981-1984.

Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2860-64.

Pankey GA, Ashcraft DS. *In vitro* synergy of ciprofloxacin and gatifloxacin against ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2959-64.

Pankey GA, Ashcraft DS. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest and time-kill assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63:228-32.

Pankey GA, Ashcraft DS. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:561-4

Pankey GA, Ashcraft DS, Dornelles A. Comparison of 3 etest® methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:220-6.

Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Spyropoulou A, Lambropoulou A, Sioulas N, Vamvakopoulou S, Karpetas G, Spiliopoulou I, Vrettos T, Anastassiou ED, Fligou F, Christofidou M, Marangos M. Molecular epidemiology and risk factors for colistin- or tigecycline-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in critically ill patients during a 7-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018; 92:235-240.

[Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, et al.](#) KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 77:169-73.

[Papagiannitsis CC, Malli E, Florou Z, Sarrou S, Hrabak J, Mantzaris K, et al.](#) Emergence of sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and VIM-1 metallo- β -lactamases in a Greek hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87:295-7.

[Papst L, Beović B, Pulcini C, Durante-Mangoni E, Rodríguez-Baño J, Kaye KS, Daikos GL, Raka L, Paul M.](#) ESGAP, ESGBIS, ESGIE and the CRGNB treatment survey study group. Antibiotic treatment of infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: an international ESCMID cross-sectional survey among infectious diseases specialists practicing in large hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:1070-1076.

[Park GC, Choi JA, Jang SJ, Jeong SH, Kim CM, Choi IS, Kang SH, Park G, Moon DS.](#) In Vitro Interactions of Antibiotic Combinations of Colistin, Tigecycline, and Doripenem Against Extensively Drug-Resistant and Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med*. 2016;36:124-30.

[Parker S, Lipman J, Koulenti D, George Dimopoulos, Jason A. Roberts.](#) What is the relevance of fosfomycin pharmacokinetics in the treatment of serious infections in critically ill patients? A systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42:289-93.

[Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP.](#) 2008. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29: 1099 –1106.

[Patel G, Bonomo RA.](#) "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 2013;4:48.

[Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, Skiada A, Andini R, Eliakim-Raz N, Nutman A, Zusman O, Antoniadou A, Pafundi PC, Adler A, Dickstein Y, Pavleas I, Zampino R, Daitch V, Bitterman R, Zayyad H, Koppel F, Levi I, Babich T, Friberg LE, Mouton JW, Theuretzbacher U, Leibovici L.](#)

Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:391-400.

Paul M. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5104-11.

Pea F, Della Siega P, Cojutti P, Sartor A, Crapis M, Scarparo C, et al. Might real-time pharmacokinetic/pharmacodynamic optimisation of high-dose continuous-infusion meropenem improve clinical cure in infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*? *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:255-8.

Peirano G, Moolman J, Pitondo-Silva A, Pitout JD. The characteristics of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from South Africa. *Scand J Infect Dis* 2012; 44:74-8.

Perez F, Bonomo RA. Evidence to improve the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:358-360.

Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: can we apply "precision medicine" to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17:761-81.

Perez F, Van Duin D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med.* 2013; 80 :225-33.

Perez F., Hujer A. M., Hujer K. M., Decker B. K., Rather P. N., Bonomo R. A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2007; 51: 3471-84.

Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 573-6.

Pfeifer Y., Schlatterer K., Engelmann E., Schiller R. A., Frangenberg H. R., Stiewe D., et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 56: 2125-28.

Pillai (a): Pillai, S., Moellering, R., and Elliopoulos, G. (2005). from "Antibiotics in Laboratory Medicine" by V. Lorian, 5th ed. (Lippincott Williams & Wilkins), p.375.

Pillai (b): Pillai, S., Moellering, R., and Elliopoulos, G. (2005). from "Antibiotics in Laboratory Medicine" by V. Lorian, 5th ed. (Lippincott Williams & Wilkins), p.371-372.

Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 5873-84.

Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, E. Papadomichelakis, A. Antoniadou, I. Tsangaris, I. Karaiskos, G. Poulakou, F. Kontopidou, A. Armaganidis, O. Cars, and H. Giamarellou. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3430-6.

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:891-7.

Poirel 2004a: Poirel L., Héritier C., Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 348-351.

Poirel 2004b: Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:15-22.

Poirel L., Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12: 826-836.

[Poirel 2007a](#): Poirel L., Wenger A., Bille J., Bernabeu S., Naas T., Nordmann P. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 2282-83.

[Poirel 2007b](#): Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2: 501-512.

[Poirel L.](#), Naas T., Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 24-38.

[Poirel L](#), Castanheira M, Carrer A et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2546-255.

[Poirel 2012a](#): Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 559-562.

[Poirel 2012b](#): Poirel L., Potron A., Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother* 2012; 67:1597-1606.

[Pontikis K](#), Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, Oikonomou A, Poulakou G, Roilides E, Giamarellou H. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:52-9.

[Potron A](#), Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 467-471.

[Pournaras S](#), Protonotariou E, Voulgari E, et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 348-52.

[Pournaras S](#), Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37:244-7.

Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. *In vitro* activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009;8:18.

Principe L, Capone A, Mazzarelli A, D'Arezzo S, Bordi E, Di Caro A, et al. *In vitro* activity of doripenem in combination with various antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Possible options for the treatment of complicated infection. *Microb Drug Resist* 2013;19:407-14

Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A et al. Ongoing epidemic of *bla*_{VIM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 59-63.

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:307-12.

Queenan A. M., Torres-Viera C., Gold H. S., Carmeli Y., Eliopoulos G. M., Moellering R. C. Jr., et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44; 3035-39.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 440-58.

Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial Agents Chemother* 2012; 56: 2108-2113.

Radice M, Power P, Gutkind G et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1068-69.

Rafailidis PI, Falagas ME. Options for treating carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2014; 27:479-483.

Rand, K. H., Houck, H. J., Brown, P. et al. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1993; 37: 613-5.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2080-6.

Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014;18:56e60.

Roussos N, Karageorgopoulos DE, Samonis G, Falagas ME. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:506-15.

Sabin C, Petrie A. *Medical statistics at a glance*. Blackwell Science, Malden, MA. 2000.

Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:695-701.

Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30: 525-9.

Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, Mishali H, Schwartz D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Asymptomatic rectal carriage of *bla*_{KPC} producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19:451-6.

Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: changing landscape and implications for therapy. *Drugs*. 2012;72:1-16.

Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among

hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1028-33.

[Schwaber MJ](#), Lev B, Israeli A, et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011; 52:848-55.

[Senda K](#), Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.*1996;34:2909-13.

[Sheng WH](#), Wang JT, Li SY, Lin YC, Cheng A, Chen YC, Chang SC. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities and synergistic activities of antimicrobial combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter species*: *Acinetobacter baumannii* versus *Acinetobacter* genospecies 3 and 13TU. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 ;70:380-6.

[Shields RK](#), Potoski BA, Haidar G, et al. Clinical outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Clin Infect Dis* 2016; 63:1615-1618.

[Shields 2017a](#): [Shields RK](#), Nguyen MH, Chen L, et al. Ceftazidime-avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: pii: e00883-17.

[Shields 2017b](#): [Shields RK](#), Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, Pandey R, Doi Y, Kreiswirth BN, Nguyen MH, Clancy CJ. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne *bla_{KPC-3}* mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e02097-16

[Shields RK](#), Nguyen MH, Chen L, et al. Pneumonia and renal replacement therapy are risk factors for ceftazidime-avibactam treatment failures and resistance among patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62: pii: e02497-17.

Sidjabat H, Nimmo GR, Walsh TR, et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to the New Delhi Metallo-beta-lactamase. Clin Infect Dis. 2011; 52:481-484.

Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM et al. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 4678-83.

Souli M, Rekatsina PD, Chryssouli Z, Galani I, Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Does the activity of the combination of imipenem and colistin in vitro exceed the problem of resistance in metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates? Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:2133-5.

Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis. 2010; 50:364-73.

Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:2395-7.

Spyropoulou A, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, et al. The first NDM metallo- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a University Hospital of Southwestern Greece. J Chemother. 2016; 28: 350-1.

Stachyra T, Levasseur P, Pechereau MC, Girard AM, Claudon M, Miossec C, Black MT. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and *Enterobacteriaceae* expressing KPC carbapenemases. J Antimicrob Chemother. 2009; 64:326 -329.

Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, et al. Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline

against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. PLoS One 2015;10:e0126479.

[Tamma PD](#), Cosgrove SE, Maragakis LL. 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Rev.25:450-470.

[Tan TY](#), Ng LS, Tan E, Huang G. *In vitro* effect of minocycline and colistin combinations on imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2007;60:421-3.

[Tan TY](#), Lim TP, Lee WH, Sasikala S, Hsu LY, Kwa AL. *In vitro* antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:436-8.

[Tangden 2014a](#): Tängdén T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerbäck P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:1757-62.

[Tangden 2014b](#): Tängdén T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Ups J Med Sci. 2014;119:149-53.

[Tangden T](#), Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. J Int Med. 2015; 277: 501-12.

[Tascini C](#), Tagliaferri E, Giani T, Leonildi A, Flammini S, Casini B, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57:3990-3.

[Temkin E](#), Torre-Cisneros J, Beovic B, et al. Ceftazidime-avibactam as salvage therapy for infections caused by carbapenem-resistant organisms. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: pii: e01964-16.

[Toledo PV](#), Aranha Junior AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP, Tuon FF. Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a rat model and time-kill assay. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:4301-4.

[Tsakris A](#), Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1257-60.

[Tsakris A](#), Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1664-71.

[Tumbarello M](#), Viale P, Viscoli C et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 943-950.

[Tumbarello M](#), Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Giacobbe DR, Bassetti M, et al., ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Societa' Italiana Terapia Antinfettiva). Infections caused by KPC producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:2133-43.

[Tumbarello 2018a](#): [Tumbarello M](#), Losito AR, Giamarellou H. Optimizing therapy in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31:566-577.

[Tumbarello 2018b](#): [Tumbarello M](#), Trecarichi EM, Corona A, De Rosa FG, Bassetti M, Mussini C et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam salvage therapy in patients with infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2018.

[Tumbarello M](#), Trecarichi EM, Corona A, De Rosa FG, Bassetti M, Mussini C, Menichetti F, Viscoli C, Campoli C, Venditti M, De Gasperi A, Mularoni A, Tascini C, Parruti G, Pallotto C, Sica S, Concia E, Cultrera R, De Pascale G, Capone A, Antinori S, Corcione S, Righi E, Losito AR, Digaetano M, Amadori F, Giacobbe DR, Ceccarelli G, Mazza E, Raffaelli F, Spanu T, Cauda R, Viale P. Efficacy of Ceftazidime-Avibactam Salvage Therapy in Patients With Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Clin Infect Dis.* 2019; 68:355-364.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Piperaki E, et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2014; 20:862-872.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin. Microbiol. Rev. 2012;25:682-707

van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Cohen Stuart JW. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect. 2014;20:345-9.

van Duin D, Cober E, Richter S, Perez F, Kalayjian RC, Salata RA, Evans S, Fowler VG, Bonomo RA, Kaye KS. Residence in skilled nursing facilities is associated with tigecycline non-susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol 2015; 36: 942-8.

van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. Clin Infect Dis. 2016;63:234-41.

van Duin D, Lok JJ, Earley M, et al. Colistin versus ceftazidime-avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis 2018; 66:163–171.

Vasoo S, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Menon SR, Krause KM, et al. In vitro activities of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam, and a panel of older and contemporary antimicrobial agents against carbapenemase-producing gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59:7842e6.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991;19:6823-31.

Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4856-61

Villegas MV, Pallares CJ, Escandon-Vargas K, Hernandez-Gomez C, Correa A, Alvarez C, Rosso F, Matta L, Luna C, Zurita J, et al. Characterization and clinical impact of bloodstream infection caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in seven Latin American countries. *PLoS One* 2016; 11:e0154092.

Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 84-8.

Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:2091-7.

Wald-Dickler N, Holtom P, Spellberg B. Busting the Myth of "Static vs Cidal": A Systemic Literature Review. *Clin Infect Dis.* 2018;66:1470-1474.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-325.

Walsh T. R., Weeks J., Livermore D. M., Toleman M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis* 2011; 11: 355-362.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 147-51.

White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1914-8.

WHO 2018: World Health Organization (WHO) Antimicrobial resistance/ Present situation/Resistance in bacteria 2018. Διαθέσιμο από: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

WHOa : World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities (2017). Διαθέσιμο από: <https://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/>

WHOb: World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva: World Health Organization; 2014. Διαθέσιμο από: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1.

WHOc: World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: WHO; 2017. Διαθέσιμο από: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf

Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect* 2017; 23:704-712.

Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(27).

Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1963-71.

Yang Y. J., Wu P. J., Livermore D. M. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* 1990; 34: 755-758.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61.

Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54.

Yoon J, Urban C, Terzian C, Mariano N, Rahal JJ. *In vitro* double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:753-7.

Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of bla IMI-2 in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1610-11.

Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1798-1803.

Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11:1333-53.

Zhang X, Lu X, Zong Z. *Enterobacteriaceae* producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 73:204-06.

Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M. Systematic review and meta-analysis of *in vitro* synergy of polymyxins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:5104-11.

Zusman O, Altunin S, Koppel F, et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and metaanalysis. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72:29-39.