

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών

Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής

Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαΐκος»

Διευθυντής (από 2013) Καθηγητής Π.Π.Σφηκάκης

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ
ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ
ΝΟΣΗΛΕΥΟΜΕΝΟΥΣ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ»**


ΚΑΛΛΙΟΠΗ Π. ΣΠΥΡΙΔΟΠΟΥΛΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΔΣΚΛΗΠΙΟΝ,
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' ΗΓΗΣΑΣΘΕ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΛΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ 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' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ, ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ Υ
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
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, 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 ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΔΥΤΑ, ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ' ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (N. 5543/1932, άρθρο 202, παρ.2).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αίτησης έναρξης διδακτορικής διατριβής
17-06-2011

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
30-07-2012
Σπυρίδων Λαδάς, Καθηγητής
Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Καθηγητής
Αναστασία Αντωνιάδου, Αν. Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)

Ημερομηνία ορισμού θέματος
30-07-2012

Ημερομηνία κατάθεσης 1^{ης} έκθεσης προόδου
27-03-2013

Ημερομηνία κατάθεσης 2^{ης} έκθεσης προόδου
23-05-2014

Αίτηση αλλαγής 3μελούς επιτροπής
13-06-2018
Αντικατάσταση του Καθηγητή κ. Σ. Λαδά
από την Επ. Καθηγήτρια κα Μ. Ψυχογιού

Ημερομηνία κατάθεσης 3^{ης} έκθεσης προόδου
22-01-2020

Ημερομηνία κατάθεσης της αίτησης επταμελούς επιτροπής
24-01-2020

Ημερομηνία έγκρισης της επταμελούς επιτροπής
26-02-2020

Μέλη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής, οι κ.κ.:

Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Σωτήριος Τσιόδρας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αντωνιάδου Αναστασία, Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών
(Επιβλέπον μέλος)

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Μιχαήλ Σαμάρκος, Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Μήνα Ψυχογιού, Αν. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

Γαρυφαλλιά Πουλάκου, Επ. Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αθηνών

Περιεχόμενα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	14
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	18
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	21
1 ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ	22
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	22
1.2 Επιδημιολογία.....	23
1.3 Παθογένεια και λοιμογόνοι παράγοντες	23
1.4 Κλινικά σύνδρομα	25
2 ΚΛΕΒΣΙΕΛΛΑ SPP.	26
2.1 Ιστορική αναδρομή.....	26
2.2 Ταξινόμηση του γένους <i>Klebsiella</i>	28
2.3 Οικολογία και Επιδημιολογία.....	30
2.4 Δομή και Αντιγονικά χαρακτηριστικά.....	32
2.5 Λοιμώξεις και κλινικά σύνδρομα.....	34
2.5.1 <i>K. pneumoniae</i>	34
2.5.2 Λοιμώξεις από λοιπά είδη <i>Klebsiella</i>	36
2.6 Παράγοντες λοιμογονικότητας.....	37
2.6.1 Προσκολλητίνες (adhesins)	38
2.6.2 Καψιδικά αντιγόνα.....	39
2.6.3 Λιποπολυσακχαρίτες.....	40
2.6.4 Σιδηροφόρα.....	41
2.7 Εργαστηριακή διάγνωση.....	42
2.7.1 Συλλογή και μεταφορά δειγμάτων	42
2.7.2 Μικροσκοπική εξέταση κλινικού δείγματος	43
2.7.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης.....	43
2.7.4 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης.....	44
2.7.5 Τυποποίηση	45
2.8 Γονιδίωμα.....	45
3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	46
3.1 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής.....	47
3.1.1 Μετάλλαξη χρωμοσωμικού DNA.....	47
3.1.2 Μεταβίβαση γενετικού υλικού.....	48
3.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής	49
3.2.1 Αδρανοποίηση των αντιβιοτικών.....	49
3.2.2 Αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης	50
3.2.3 Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα.....	50
3.2.4 Αντλίες εκροής	50
3.3 <i>Klebsiella spp.</i> και ευαισθησία στα αντιβιοτικά	51
4 Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	53
4.1 Πενικιλίνες	54
4.2 Κεφαλοσπορίνες.....	55
4.3 Μονομπακτάμες	56
4.4 Καρβαπενέμες.....	56
4.5 Αναστολείς των β-λακταμασών	57

5	ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	58
5.1	Λειτουργική ταξινόμηση β-λακταμασών	59
5.2	Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών.....	59
6	ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ	60
6.1	Ταξινόμηση καρβαπενεμασών.....	61
6.1.1	Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης Α	61
6.1.2	Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης Β ή μεταλλο-β-λακταμάσες	64
6.1.3	Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης D (ΟΧΑ-τύπου καρβαπενεμάσες).....	66
6.2	Ανίχνευση καρβαπενεμασών.....	69
6.2.1	Τροποποιημένο Hodge test (Modified Hodge Test, MHT).....	69
6.2.2	Ανίχνευση των MBLs με χηλικούς παράγοντες.....	71
6.2.3	Ανίχνευση των KPCs με παράγωγα βορονικού οξέος	72
6.2.4	Ανίχνευση με τη χρήση χρωμογόνου θρεπτικού υλικού.....	74
6.2.5	Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών.....	75
6.3	Επιδημιολογία καρβαπενεμασών.....	76
7	ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΜΕ CP-ΚΡ ΣΤΕΛΕΧΗ	80
7.1	Ορισμός αποικισμένου ασθενούς.....	80
7.2	Ανατομικές θέσεις αποικισμού.....	80
7.3	Παράγοντες κινδύνου	81
7.4	Διάρκεια αποικισμού.....	82
7.5	Μηχανισμοί μετάδοσης.....	83
8	ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ CP-ΚΡ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	84
8.1	Ορισμός CP-Κρ λοίμωξης.....	84
8.2	Είδη λοιμώξεων	84
8.3	Παράγοντες κινδύνου	85
8.4	Έκβαση CP-Κρ λοίμωξεων.....	86
8.5	Θεραπεία CP-Κρ λοίμωξεων	88
9	ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ CPE.....	90
9.1	Η υγιεινή των χεριών	90
9.2	Τα μέτρα επαφής	92
9.3	Η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση	93
9.4	Ημόνωση ή συννοσηλεία των αποικισμένων ασθενών	94
9.5	Αποκλειστικό νοσηλευτικό προσωπικό	95
9.6	Η απολύμανση του περιβάλλοντος.....	96
9.7	Η κατανάλωση των αντιβιοτικών.....	97
9.8	Μείωση της φορείας με χρήση αντισηπτικών.....	98
9.9	Ο ρόλος της εκπαίδευσης.....	99
9.10	Επίβλεψη της εφαρμογής των μέτρων.....	99
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		101
1	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	102
2	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	103
2.1	Σχεδιασμός της μελέτης	103
2.2	Ορισμοί – Διευκρινίσεις	106
2.2.1	Ορισμός αποικισμένου ασθενούς	106
2.2.2	Ορισμός αποικισμένου ασθενούς κατά την εισαγωγή.....	106
2.2.3	Ορισμός αποικισμένου ασθενούς κατά τη νοσηλεία	106
2.2.4	Ορισμός μεμονωμένου κρούσματος ασθενούς με λοίμωξη	107
2.2.5	Ορισμός αρνητικοποίησης αποικισμένου ασθενούς	107
2.3	Δέσμη μέτρων.....	108
2.3.1	Ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση	110

2.3.2	Διαχωρισμός φορέων από μη φορείς.....	111
2.3.3	Αποκλειστικός νοσηλευτής για τους φορείς.....	111
2.3.4	Μέτρα επαφής.....	112
2.3.5	Ενίσχυση της συμμόρφωσης με την υγιεινή των χεριών.....	113
2.3.6	Πρόγραμμα περιορισμού της χρήσης των αντιβιοτικών.....	115
2.3.7	Επίβλεψη της συμμόρφωσης με την δέσμη μέτρων.....	116
2.4	<i>Μικροβιολογική επιτήρηση CP-Kr αποικισμένων.....</i>	<i>120</i>
2.4.1	Απομόνωση και Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	120
2.4.2	Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία καρβαπενεμάσης.....	121
2.4.3	Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμάσης.....	124
2.4.4	Τυποποίηση στελεχών με PFGE.....	126
2.5	<i>Συλλογή δεδομένων.....</i>	<i>128</i>
2.6	<i>Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....</i>	<i>129</i>
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	132
3.1	<i>Πληθυσμός της μελέτης.....</i>	<i>132</i>
3.2	<i>CP-Kr αποικισμοί και λοιμώξεις κατά την εφαρμογή των μέτρων.....</i>	<i>133</i>
3.3	<i>Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά CP-Kr στελεχών.....</i>	<i>134</i>
3.4	<i>Βακτηριακίμεις από CP-Kr στελέχη και από οποιοδήποτε παθογόνο πριν από και μετά την εφαρμογή της δέσμης μέτρων.....</i>	<i>139</i>
3.5	<i>Κατανάλωση αντιβιοτικών πριν από και μετά την εφαρμογή της δέσμης μέτρων.....</i>	<i>141</i>
3.6	<i>Συμμόρφωση με τη δέσμη μέτρων.....</i>	<i>143</i>
3.7	<i>Αποτελεσματικότητα της δέσμης μέτρων.....</i>	<i>145</i>
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	152

Βιογραφικό σημείωμα

Όνοματεπώνυμο: **Καλλιόπη Σπυριδοπούλου**

Ηλεκτρονική Αλληλογραφία: kaspyrido@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ-ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

12/2013

Λήψη τίτλου ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας

24/01/2012-Σήμερα

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με τίτλο:

«Μελέτη της δυναμικής διασποράς ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *Klebsiella pneumoniae* σε ασθενείς νοσηλευόμενους σε Αιματολογική Κλινική»

11/2007-06/2010

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη «Βιοπληροφορική», βαθμός «Άριστα» (9,5)

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα:

«Μετα-ανάλυση μελετών Φαρμακογονιδιοματικής: Συσχέτιση της τοξικότητας της μεθοτρεξάτης (MTX) με πολυμορφισμούς του ενζύμου αναγωγή του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού (MTHFR)»

1999-2005

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, σειρά εισαγωγής τρίτη, βαθμός πτυχίου «Λίαν Καλώς» (7,95)

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Υποτροφία ως πρωτεύουσα φοιτήτρια στο Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη «Βιοπληροφορική», Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

22/02/2016 - Σήμερα

Βιοπαθολόγος στο ιδιωτικό βιοπαθολογικό εργαστήριο Βιοιατρική Παρούσα θέση από 11/2017 : Επιστημονική υπεύθυνη στη μονάδα Δάφνης, Λεωφ. Βουλιαγμένης 191

01/01/2014 - 31/05/2015

Επιστημονικός συνεργάτης Ερευνητικού Εργαστηρίου Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας "Γ.Κ. ΔΑΪΚΟΣ" της Α Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

1/4/2014-30/11/2014

Βιοπαθολόγος στο ιδιωτικό βιοπαθολογικό εργαστήριο Genelabs-Γονιδιωματική, Παστέρ 15 Πλατεία Μαβίλη

18/2/2009-17/8/2013

Ειδικευόμενη ιατρός στη «Μικροβιολογία - Ιατρική Βιοπαθολογία», Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών.

07/2008-12/2008

Εφημερέων ιατρός, Κλινική Ιασις Πειραιά - Ιατρικό Κέντρο Αθηνών

24/04/2006-25/04/2007

Ιατρός Υπηρεσίας Υπαίθρου, Γενικό Νοσοκομείο - Κέντρο Υγείας Νάξου

19/01/2006-18/04/2006

Τρίμηνη Εκπαίδευση στη Παθολογική, Χειρουργική και Καρδιολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Σύρου «Βαρδακείου & Πρωΐου»

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ - ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

01/08/2014-31/03/2015

Πρόγραμμα «Αριστοτέλης» - Πρόγραμμα Δευτερογενούς Πρόληψης για την Αντιμετώπιση της Εξάπλωσης του HIV/AIDS στους Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών στην Αθήνα. Συλλογή επιδημιολογικών, κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων από HIV-ασθενείς από Μονάδες Ειδικών Λοιμώξεων (ΜΕΛ) που συνδέονται με το πρόγραμμα «Αριστοτέλης». Χρηματοδότηση ΕΣΠΑ 2007-2013

01/12/2014-31/05/2015

«AIDA-Preserving old antibiotics for the future assessment of clinical efficacy by a pharmacokinetic / pharmacodynamics approach to optimize effectiveness and reduce resistance for off-patient antibiotics» Φορέας Χρηματοδότησης, European Commission

01/01/2014-19/02/2015

Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με διπλό εικονικό φάρμακο, διεθνής μελέτη φάσης III, για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας 300 mg ή 600 mg Ζαναμιβίρης, χορηγούμενης ενδοφλεβίως δις ημερησίως, σε σύγκριση με 75 mg Οσελταμιβίρης, χορηγούμενης από του στόματος δις ημερησίως, για τη θεραπεία ενηλίκων και εφήβων που νοσηλεύονται λόγω Γρίπης.

Χρηματοδότηση εταιρία φαρμακευτικών προϊόντων GlaxoSmithKline

01/09/2014-30/09/2014

«aMASE: Προώθηση της Πρόσβασης των Μεταναστών στο Σύστημα Υγείας στην Ευρώπη» - «Διεξαγωγή επιδημιολογικής μελέτης» στο πλαίσιο της πράξης «Υλοποίηση Ολοκληρωμένου Προγράμματος ελέγχου της HIV Λοίμωξης σε ομάδες υψηλού κινδύνου» που υλοποιείται από την εταιρεία PRAKSIS στο πλαίσιο του Ε.Π. «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ».

Χρηματοδότηση Υπουργείο Εργασίας και Κοινωνικής Ασφάλισης

01/04/2015-30/04/2015

Respiratory Virus Outpatient Study (FLU 002 Plus) - An International Observational Study to Characterize Adults With Influenza or Other Targeted Respiratory Viruses.

Χρηματοδότηση University of Minnesota - Clinical and Translational Science Institute, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Containing Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in an Endemic Setting. **Spyridopoulou Kalliopi**, Psychogiou Mina, Sypsa Vana, Miriagou Vivi, Karapanou Amalia, Hadjihannas Linos, Tzouvelekis Leonidas, Daikos L George. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020 Jul 6;9(1):102. doi: 10.1186/s13756-020-00766-x.
2. KPC-Producing, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 as a Typical Opportunistic Pathogen. Tzouvelekis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, **Spyridopoulou K**, Athanasiou E, Karagouni E, Tzelepi E, Daikos GL. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Oct;57(10):5144-6. doi: 10.1128/AAC.01052-13. Epub 2013 Jul 15.

3. Colonization of high-risk children with carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Greece. Mougkou K, Michos A, **Spyridopoulou K**, Daikos GL, Spyridis N, Syriopoulou V, Zaoutis T. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jul;34(7):757-9. doi: 10.1086/670997. Epub 2013 May 22.
4. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouvelekis LS, **Spyridopoulou K**, Daikos GL. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov;67(11):2777-9. doi: 10.1093/jac/dks270. Epub 2012 Jul 10.
5. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. **Spyridopoulou K**, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. *Pharmacogenet Genomics.* 2012 Feb;22(2):117-33. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834ded2a.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Kontzoglou K.K, Angelousi A.G, **Spyridopoulou P.K**, Stamatakos M.K.: "Jaundice: Should yellow be a red code?", 45th Annual Congress of the European Society of Surgical Research, June 2010, Geneva
2. Anna Angelousi, Michael Stamatakos, Despoina Manousaki, **Kalliopi Spyridopoulou**, Konstantinos Kontzoglou: "The relation of the history of hypothyroidism with the risk for breast cancer: A review", 78e Assemblée Annuelle de la Société Suisse de Médecine Interne, mai 2010, Basel

3. Mougkou K, Michos A, **Spyridopoulou K**, Spyridis N, Siahaniidou T, Korkas A, Anagnostakou M, Papagaroufalis C, Baroutis G, Labadaridis I, Daikos G.L, Syriopoulou V, Zaoutis T: "COLONIZATION OF NEONATES WITH CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE (CPE)", ESPID 2012 Thessaloniki, Greece, May 8-12, 2012
4. Successful control of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (CP-Kp) transmission in a haematology unit: The pivotal role of active surveillance. **K.Spyridopoulou**, M. Psychogiou, V. Sypsa, D. Goukos, V. Miriagou, A. Markogiannakis, A. Karapanou, P. Flevari, G. Gainaru, K. Koutsi, J. Meletis, G.L. Daikos. 25th ECCMID in Copenhagen, Denmark, 25 - 28 April 2015

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ι.Μανιάκης, **Κ.Σποριδοπούλου**, Ι.Δεληολάνης, Π.Γαλάνης, Σ.Νεοφωτίστου, Ι.Στεφάνου: «Ουρολοιμώξεις σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού», 37ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 2011, Αθήνα
2. Ι. Τόμπρου, **Κ. Σποριδοπούλου**, Χ. Σαλδάρη, Κ. Θεοδωρίδου, Π. Κανελλόπουλος, Α. Τάκου, Α. Κουτρομπέλλη, Δ. Χατζηζαχαριάς, Γ. Μαρόπουλος, «Επίπεδα βιοχημικών δεικτών σε οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου» 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας, Οκτώβριος 2013, Αθήνα
3. Μ. Ψυχογιού, Π. Φιλιππίδης, Δ. Τσιλιγγίρης, **Κ.Σποριδοπούλου**, Ε. Καραμάνου, Μ. Δημητροπούλου, Μ. Μιχαήλ, Β. Σύψα, Α. Χατζάκης, Γ. Δαΐκος, «Αξιολόγηση της σύνδεσης (linkage) και διατήρησης σε

παρακολούθηση (retention to care) των Χρηστών Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών (ΧΕΝ) με HIV λοίμωξη: Εμπειρία από μια Μονάδα Λοιμώξεων» 26ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Νοέμβριος 2014, Αθήνα

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

1. Αγγλικά, University of Cambridge, Certificate of Proficiency in English
2. Γαλλικά, Université de Paris - Sorbonne, Diplôme d'Études Françaises (2e Degré)

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

1. Γνώσεις χειρισμού Η/Υ (κειμενογράφος, παρουσιάσεις κλπ) και πλοήγησης στο Internet
2. Εφαρμογές Βιοπληροφορικής

Πρόλογος

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει παρατηρηθεί μία ταχεία αύξηση της εξάπλωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών στελεχών σε παγκόσμιο επίπεδο [1]. Κυρίαρχο νοσοκομειακό παθογόνο με αντοχή στις καρβαπενέμες αναδεικνύεται μεταξύ των Εντεροβακτηριακών μικροβίων η *Klebsiella pneumoniae*, με συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, να καταγράφουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά εμφάνισης στο νοσοκομειακό περιβάλλον [2-5].

Ο βασικός μηχανισμός αντοχής των Εντεροβακτηριακών στελεχών στις καρβαπενέμες μεσολαβείται από πλασμιδιακά κωδικοποιούμενα ένζυμα της κατηγορίας των β-λακταμασών (καρβαπενεμάσες) [2, 6]. Τα ένζυμα που απαντούν συχνότερα περιλαμβάνουν τις KPCs (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) και τις μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM, IMP και NDM. Τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ή CP-Kp) επιδεικνύουν έναν εξαιρετικά ανθεκτικό αντιμικροβιακό φαινότυπο, προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις με υψηλά ποσοστά θνητότητας και μεταδίδονται ταχύτατα μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών [7-11]. Ενδημικές περιοχές του πλανήτη αναδεικνύονται η νότια Ευρώπη, οι Η.Π.Α, οι Ινδίες και η Άπω Ανατολή [12].

Η εισαγωγή τέτοιων στελεχών σε ένα σύστημα παροχής υπηρεσιών υγείας με χαμηλή συμμόρφωση με τα μέτρα πρόληψης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων οδηγεί σύντομα στον αποικισμό σημαντικού αριθμού ασθενών. Η διασπορά τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον πιστεύεται ότι γίνεται κυρίως μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας από ασυμπτωματικούς φορείς και ασθενείς με λοίμωξη σε άλλους νοσηλευόμενους [13, 14]. Βασικό βήμα για τον αποτελεσματικό έλεγχο της διάδοσης CP-Kp στελεχών είναι η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους τα

στελέχη αυτά εισχωρούν στα νοσηλευτικά ιδρύματα και η αξιολόγηση των διαφόρων προτεινόμενων μέτρων για τον περιορισμό τους [14-16].

Σε πολλές περιπτώσεις, η λήψη πολλών και διαφορετικών μέτρων είναι δυσχερής. Κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητο να διευκρινιστεί πλήρως η οδός διασποράς των πολυανθεκτικών νοσοκομειακών στελεχών και να αξιολογηθούν τα προτεινόμενα μέτρα πρόληψης και ελέγχου. Για το σκοπό μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαθηματικά μοντέλα, όπως το μοντέλο των Ross-Macdonald [17, 18]. Η εφαρμογή του παραπάνω μοντέλου σε δεδομένα από Χειρουργική Κλινική τεταρτοβάθμιου νοσοκομείου έδειξε ότι η κύρια οδός διασποράς CP-Kp στελεχών αποτελεί η μεταφορά μέσω των επαγγελματιών υγείας και ανέδειξε την εντατική μικροβιολογική επιτήρηση και μόνωση των αποικισμένων ασθενών ως ικανά μέτρα για τον γρήγορο περιορισμό τους [19].

Επιπρόσθετα, διάφοροι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό και λοίμωξη από CP-Kp στελέχη έχουν προταθεί από πολλούς ερευνητές. Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την προηγούμενη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, τη νοσηλεία σε μονάδες εντατικής θεραπείας και τα χρόνια νοσήματα. Άλλοι παράγοντες κινδύνου αναδεικνύονται η μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, η μακροχρόνια νοσηλεία, η μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, η παρουσία καθετήρων και ενδαγγειακών γραμμών και οι προηγηθείσες χειρουργικές επεμβάσεις [11, 20-26]. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά μικρόβια απειλούν ιδιαίτερα άτομα με διαταραχές του ανοσολογικού συστήματος. Το γεγονός αυτό καταδεικνύεται χαρακτηριστικά σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, στους οποίους τα μυελοκατασταλτικά και ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα των κυτταροστατικών συμβάλλουν περαιτέρω στην αποδυνάμωση των αμυντικών μηχανισμών. Επιπλέον, οι αιματολογικοί ασθενείς αναγκάζονται σε

συχνές και μακροχρόνιες νοσηλείες, καθώς και σε ποικίλους ιατρονοσηλευτικούς χειρισμούς, που τους καθιστούν επιρρεπείς σε νοσοκομειακές λοιμώξεις [27, 28].

Με δεδομένο μία αύξηση στην επίπτωση των βακτηριαμιών από CP-Kp στελέχη στην Αιματολογική κλινική του «Γ.Ν.Α. Λαϊκό» κατά τα έτη 2010 - 2011 με καταστροφικές συχνά συνέπειες, πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη με σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα μίας δέσμης προτεινόμενων μέτρων για τον περιορισμό της μετάδοσης CP-Kp μικροοργανισμών μεταξύ νοσηλευόμενων ασθενών με αιματολογικά νοσήματα. Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της δυναμικής της διασποράς των CP-Kp στελεχών σε νοσηλευόμενους ασθενείς με αιματολογικές παθήσεις και θα επιτρέψει την εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου της διασποράς και των λοιμώξεων από CP-Kp στελέχη σε ευπαθείς ομάδες ασθενών.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαΐκος» της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστίες

Στην προσπάθεια ολοκλήρωσης αυτής της ερευνητικής εργασίας βρήκα συνοδοιπόρους και συμπαραστάτες του Επιμελητές και τους συναδέλφους μου, τους οποίους και αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Γεώργιο Λ. Δαϊκό, ο οποίος θα αποτελεί για εμένα πάντα πρότυπο δασκάλου, επιστήμονα και ανθρώπου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος, αλλά και για την εμπιστοσύνη και κατανόηση που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα, καθώς και για όλες τις πολύ μεγάλες ευκαιρίες που μου έχει δώσει μέχρι σήμερα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Αν. Καθηγήτρια κα. Α. Αντωνιάδου για την προσφορά της στην έναρξη αυτής της προσπάθειας, καθώς και την ακούραστη συμμετοχή της για την ολοκλήρωση της.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Μήνα Ψυχογιού για τη συμβολή της στο σχεδιασμό και εκτέλεση της μελέτης, για τις πολύτιμες συμβουλές της, την καλοσύνη, τη μεγάλη προθυμία και τη συνεχή παρουσία της και υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Ευγνωμοσύνη χρωστάω στη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Βασιλική - Αναστασία Σύψα για τη βοήθεια της στην ερμηνεία και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την βιολόγο κα. Βιβή Μυριαγκού και το βιολόγο κ. Δημήτριο Γούκο για τη συνεισφορά τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στη μοριακή ανάλυση των στελεχών, χωρίς την οποία απλά δεν θα τα είχα καταφέρει. Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό και τους συνεργάτες του Ερευνητικού Εργαστηρίου Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαϊκος». Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Αιματολογικής Κλινικής του «Γ.Ν.Α. Λαϊκό»

και ιδιαίτερα τον Καθηγητή κο. Ιωάννη Μελέτη για την εμπιστοσύνη και τη συμπαράσταση που επέδειξαν καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Τίποτα, όμως από όλα αυτά δε θα είχε πραγματοποιηθεί αν δεν είχα την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη από την οικογένεια μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου και τον σύζυγό μου για όλα όσα μου πρόσφεραν μέχρι σήμερα.

Γενικό μέρος

1 Εντεροβακτηριακά

Τα Εντεροβακτηριακά είναι η μεγαλύτερη οικογένεια Gram αρνητικών βακτηρίων [29]. Περιλαμβάνει ποικιλία μικροοργανισμών που απομονώνονται στο περιβάλλον, αλλά και ως μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του πεπτικού συστήματος του ανθρώπου και των ζώων. Ωστόσο, πολλά μέλη της οικογένειας απομονώνονται από κλινικά δείγματα και είναι υπεύθυνα για άλλοτε άλλης βαρύτητας λοιμώξεις. Η οικογένεια των Εντεροβακτηριακών αποτελεί το μοναδικό εκπρόσωπο της τάξης Enterobacteriales, που ανήκει στην κλάση Gammaproteobacteria [30] του φύλου Proteobacteria. Σημαντικά παθογόνα της ομάδας περιλαμβάνουν είδη των γενών *Shigella*, *Salmonella* και *Yersinia*. Ωστόσο, συχνές είναι και οι λοιμώξεις που προκαλούνται από Εντεροβακτηριακά μικρόβια που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* κ.α.).

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια μεσαίου μεγέθους μήκους 1-5 μm περίπου. Είναι μη σπορογόνα, κινητά ή ακίνητα [31]. Αναπτύσσονται σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (προαιρετικά αναερόβια). Καλλιεργούνται σε συνήθη θρεπτικά υλικά χωρίς προσθήκη NaCl ή άλλου συμπληρώματος. Στο αιματούχο άγαρ σχηματίζουν μικρές γκρι αποικίες. Αναπτύσσονται εξίσου καλά σε MacConkey άγαρ, όπου ανάλογα με τη ζύμωση ή όχι της λακτόζης διακρίνονται σε λακτόζη θετικά και λακτόζη αρνητικά. Τα πρώτα

παρουσιάζουν αποικίες κόκκινου χρώματος, ενώ οι αποικίες των μη ζυμώντων τη λακτόζη εμφανίζονται άχρωμες [32]. Επιπλέον, μεταβολίζουν τη D-γλυκόζη, είναι καταλάση θετικά και οξειδάση αρνητικά, ενώ τα περισσότερα ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη. Η αναλογία των βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης στο γονιδιώμά τους κυμαίνεται από 39% έως 59%. Η ευαισθησία στις διάφορες ομάδες αντιβιοτικών παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία μεταξύ των μελών της οικογένειας [33, 34].

1.2 Επιδημιολογία

Τα Εντεροβακτηριακά βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος και νερό) και αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων [35, 36]. Συγκεκριμένα, απαντούν στη φυσιολογική χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Έτσι, ορισμένα είδη έχουν περιορισμένο οικολογικό περιβάλλον και σχετίζονται πάντα με νόσο (π.χ *Salmonella typhi*), ενώ άλλα αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του οργανισμού και εμπλέκονται σε ευκαιριακές λοιμώξεις.

1.3 Παθογένεια και λοιμογόνοι παράγοντες

Η πρόκληση νόσου από ένα μικροβιακό παράγοντα είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του μικροβιακού στελέχους και των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή [37, 38]. Σε άτομα με κάποιου είδους ανοσολογικό έλλειμμα οποιοδήποτε στέλεχος μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη λοίμωξης. Αντίθετα, ανοσολογικά επαρκή άτομα εκδηλώνουν λοιμώξεις όταν προσβληθούν από μικροβιακό στέλεχος που διαθέτει ορισμένους παράγοντες λοιμογονικότητας.

Πρωταρχικό βήμα για την πρόκληση νόσου είναι η προσκόλληση και ο αποικισμός του Εντεροβακτηριακού στελέχους σε μια ανατομική θέση του μεγαλοοργανισμού. Ακολούθως, τα μικροβιακά κύτταρα καλούνται να αποφύγουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, να πολλαπλασιαστούν και να προκαλέσουν βλάβη στους ιστούς του.

Η προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή επιτυγχάνεται με ειδικές επιφανειακές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας. Η επιβίωση των μικροβίων στο αφιλόξενο συχνά περιβάλλον του ξενιστή επιτυγχάνεται με επιπλέον λοιμογόνους παράγοντες, όπως η παραγωγή εξωτοξινών και η παρουσία προστατευτικών δομών (π.χ. έλυτρο ή κάψα). Στους λοιμογόνους παράγοντες ανήκει ο λιποπολυσακχαρίτης ή ενδοτοξίνη (LPS) [39, 40], που αποτελεί συστατικό της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης και είναι υπεύθυνος για πολλές από τις συστηματικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά, όπως πυρετός, λευκοπενία, λευκοκυττάρωση, θρομβοπενία, σηπτικό σοκ και θάνατο. Τα μόρια του λιποπολυσακχαρίτη βρίσκονται συνδεδεμένα στην εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη μέσω ενός μοναδικού μορίου που ονομάζεται λιπίδιο A. Ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το λιπίδιο A είναι ένα σάκχαρο με οκτώ άτομα άνθρακα που με τη σειρά του συνδέεται με μία αλυσίδα σακχάρων που σχηματίζουν το αντιγόνο O. Επιπρόσθετα, ορισμένα είδη επιβιώνουν ενδοκυτταρίως, ενώ άλλα παράγουν αιμολυσίνες και σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες.

Η ιστική βλάβη είναι αποτέλεσμα των μικροβιακών τοξικών παραγόντων, αλλά συχνά επιτείνεται από την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού (φλεγμονώδης αντίδραση), η οποία ξεπερνά τα απαραίτητα όρια για τον περιορισμό της λοίμωξης.

1.4 Κλινικά σύνδρομα

Περίπου 20-25 είδη Εντεροβακτηριακών είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτή την ομάδα βακτηρίων. Σχετίζονται με λοιμώξεις της κοινότητας, αλλά και με σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Φαίνεται να αποτελούν το 80% των κλινικά σημαντικών στελεχών όσον αφορά τα Gram αρνητικά βακτήρια και το 50% των κλινικά σημαντικών βακτηρίων που απομονώνονται από τα μικροβιολογικά εργαστήρια [41]. Επιπλέον, στα Εντεροβακτηριακά οφείλονται το 50% περίπου των βακτηριαιμιών. Τα κλινικά σύνδρομα που προκαλούν διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις εντερικές και εξωεντερικές λοιμώξεις.

Λοίμωξη γαστρεντερικού προκαλούν τέσσερα κυρίως γένη Εντεροβακτηριακών: *Escherichia* [42-44], *Salmonella* [45, 46], *Shigella* [47] και *Yersinia* [48]. Λιγότερο συχνά και χωρίς καλή τεκμηρίωση ενοχοποιούνται είδη *Citrobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella* κ.α [49].

Οι συχνότερες λοιμώξεις εκτός γαστρεντερικού περιλαμβάνουν τις ουρολοιμώξεις (κυστίτιδα, πυελονεφρίτιδα, προστατίτιδα), λοιμώξεις αναπνευστικού, επιμολύνσεις τραυμάτων, βακτηριαιμίες και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος [50]. Ειδικότερα, η σηψαιμία από Εντεροβακτηριακά στελέχη αποτελεί κατά κανόνα νοσοκομειακή κλινική οντότητα με καταστροφικές συχνά συνέπειες. Γι' αυτό απαιτεί την έγκαιρη κλινική υποψία και μικροβιολογική επιβεβαίωση με στόχο την ταχύτερη έναρξη κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής.

2 *Klebsiella spp.*

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, μήκους 1-2 μm, λίγο κοντύτερα από την *Escherichia coli*, φέρουν ινίδια, είναι ελυτροφόρα, ακίνητα, αερόβια και δυνητικά αναερόβια. Το πολυσακχαριδικό έλυτρο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες όταν τα μικρόβια αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά πλούσια σε υδατάνθρακες. Υπ' αυτές τις συνθήκες, σχηματίζουν ιδιαίτερα βλενώδεις αποικίες στο άγαρ. Το έλυτρο προσφέρει στο βακτήριο προστασία έναντι της δράσης των φαγοκυττάρων. Τα κύρια αντιγόνα είναι το σωματικό O και το αντιγόνο K του ελύτρου. Επιπλέον, τα περισσότερα στελέχη εκφράζουν ινίδια. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C. Όσον αφορά στις βιοχημικές ιδιότητες, όπως και τα υπόλοιπα Εντεροβακτηριακά ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, ανάγει τα νιτρικά, παράγει καταλάση αλλά όχι οξειδάση και είναι θετική στο Voges-Proskauer τεστ. Η *Klebsiella pneumoniae* είναι το πιο σημαντικό από κλινικής σημασίας μέλος του γένους *Klebsiella* [51].

2.1 *Ιστορική αναδρομή*

Το γένος *Klebsiella* της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών πήρε το όνομά του προς τιμήν του Γερμανού μικροβιολόγου Edwin Klebs (1834–1913) [52]. Το πρώτο είδος *Klebsiella* που περιγράφηκε ήταν ένας ελυτροφόρος βάκιλλος από ασθενείς με ρινοσκλήρωμα (Von Frisch, 1882). Το βακτήριο αυτό ονομάστηκε *Klebsiella rhinoscleromatis* από τον Trevisan (1887). Το 1893 ο Abel παρατήρησε έναν άλλο ελυτροφόρο βάκιλλο στις ρινικές εκκρίσεις ασθενών με όζαινα. Το βακτήριο αυτό ταξινομήθηκε αργότερα στο γένος *Klebsiella* ως *Klebsiella ozaenae*.

Το 1882 ο Friedländer περιέγραψε ένα βακτήριο στους ιστούς πνευμόνων ασθενούς που κατέληξε από πνευμονία. Ο μικροοργανισμός αυτός ονομάστηκε *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887). Για αρκετά χρόνια, επικράτησε σύγχυση καθώς ο μικροοργανισμός αυτός δεν μπορούσε να διαχωριστεί από το βακτήριο που περιγράφηκε αρχικά ως *Bacterium lactis aerogenes* (Escherich, 1885) και το οποίο τελικά μετονομάστηκε σε *Enterobacter aerogenes* [53]. Τα δύο βακτήρια ζύμωναν αρκετούς υδατάνθρακες, έδιναν θετική την αντίδραση Voges-Proskauer και αντιδρούσαν με αντιορό έναντι του ελύτρου της *Klebsiella*. Σημαντικό βήμα αποτέλεσε η κατάταξη της *Klebsiella* ως ακίνητου βακτηρίου και αρνητικού για την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, ενώ το *Enterobacter aerogenes* είναι κινητό και θετικό για την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης [54].

Το 1886 ο Flügge περιέγραψε το βακτήριο *Bacillus oxytocus perniciosus*. Ο μικροοργανισμός αυτός ονομάστηκε *Aerobacter oxytocum* [55] και *Klebsiella oxytoca* [56]. Για πολλά χρόνια, η ύπαρξη αυτού του είδους ήταν υπό αμφισβήτηση και πολλοί το θεωρούσαν ως υποείδος της *Klebsiella pneumoniae*. Ωστόσο, μελέτες συσχέτισης DNA έδειξαν την *K. oxytoca* ως ένα σαφώς ξεχωριστό είδος από την *K. pneumoniae*.

Η εφαρμογή δοκιμασιών χρησιμοποίησης πηγών άνθρακα και ο υβριδισμός του DNA οδήγησε στον χαρακτηρισμό δύο ακόμα ειδών *Klebsiella* από περιβαλλοντικά κυρίως δείγματα. Πρόκειται για τα είδη *K. terrigena* [57] και *K. planticola* [58]. Η ονομασία *K. ornithinolytica* προτάθηκε για ορισμένα ινδόλη θετικά και ορνιθίνη θετικά στελέχη *Klebsiella*.

Το μικροβιακό αίτιο του βουβωνικού κοκκιώματος, *Calymmatobacterium granulomatis*, βρέθηκε να σχετίζεται στενά με την *K. pneumoniae*. Για το λόγο αυτό,

προτάθηκε από διαφορετικούς ερευνητές να μεταφερθεί στο γένος *Klebsiella* ως *Klebsiella granulomatis*.

2.2 Ταξινόμηση του γένους *Klebsiella*

Η τρέχουσα ταξινόμηση του γένους *Klebsiella* αναγνωρίζει τα ακόλουθα βασικά είδη: *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella variicola* και *Klebsiella planticola* με διάφορα υποείδη (NCBI taxonomy. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information). Ο πίνακας 1 συνοψίζει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Klebsiella* και των υποειδών της *Klebsiella pneumoniae* [52].

Η *Klebsiella pneumoniae* κλινικά είναι το πιο σημαντικό μέλος του γένους *Klebsiella* και περιλαμβάνει τα υποείδη *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ssp. rhinoscleromatis* και *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae*. Είναι Gram-αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο, μη κινούμενο ραβδοειδές βακτήριο που περιέχει έλυτρο και ζυμώνει τη λακτόζη. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του στόματος, του δέρματος και του εντέρου [59]. Οι λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae* παρατηρούνται κυρίως σε άτομα με εξασθενημένο αμυντικό σύστημα. Προσβάλλουν κυρίως άρρενες μέσης ηλικίας και ηλικιωμένους με διαβήτη, αλκοολισμό, κακοήθειες, ασθένειες του ήπατος, χρόνιες αποφρακτικές πνευμονικές παθήσεις, θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, νεφρική ανεπάρκεια και μερικές επαγγελματικές εκθέσεις [60].

Πίνακας 1- Βιοχημικές ιδιότητες των ειδών *Klebsiella*

	<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>ssp.</i> <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
Growth at 5°C	-	-	-	-	+	+	+
Growth at 41°C	+	+	+	+	-	d	+
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Urea hydrolyzed	+	D	-	+	+	+	+
Pectate hydrolyzed	-	-	-	+	-	-	-
ONPG test	+	+	-	+	+	+	+
Indole produced	-	-	-	+	-	d	+
Voges-Proskauer test	+	-	-	+	+	+	+
Malonate test	+	-	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylated	+	D	-	+	+	+	+
Ornithine decarboxylated	-	-	-	-	-	-	+
Glucose dehydrogenase without added PQQ	+	-	-	-	-	-	ND
with PQQ added	+	-	-	+	+	+	ND
Gluconate dehydrogenase	+	-	-	-	+	+	ND
Utilization of							
Adonitol	d	+	(+)	+	+	+	+
D-Alanine	+	+	-	+	+	+	+
L-Arabitol	-	-	-	d	-	-	-
Benzoate	d	-	-	d	d	+	+
Dulcitol	d	-	-	d	-	d	d
i-Erythritol	-	-	-	-	-	(d)	d
D-Galacturonate	+	+	-	+	+	+	+
D-Glucuronate	+	+	-	+	+	+	+
Histamine	-	-	-	-	d	+	d
5-Ketogluconate	d	-	-	+	+	+	+
Lactulose	+	D	-	+	(+)	+	+
Malonate	d	-	D	(d)	-	(d)	d
Maltitol	+	+	-	+	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	d	+	-	-
1-O-Methyl-b-galactoside	+	+	-	+	+	+	+
3-O-Methyl-d-glucose	-	-	-	-	+	+	+
1-O-Methyl-a-d-glucoside	d	+	-	+	+	+	+
Mucate	+	D	-	+	+	+	(+)
Phenylacetate	d	D	-	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	D	+	+	+	+	+
D-Saccharate	+	D	D	+	+	+	(+)
D-Sorbitol	+	D	D	+	+	+	+
Sucrose	+	D	+	+	+	+	+
D-Tagatose	d	-	-	d	-	d	d
D-Tartrate	d	-	-	-	-	(d)	d
Trigonelline	-	-	-	-	-	-	-
Tryptamine	-	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	d	D	-	d	-	(d)	d
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylitol	d	-	-	(d)	-	d	d

Symbols and abbreviations: +, 95–100% strains positive in 1–2 days (utilization tests) or in 1 day (other tests); (+), 95–100% strains positive in 1–4 days; -, 95–100% strains negative in 4 days; d, different reactions; ND, no data ONPG, 2-nitrophenylb-d-galactopyranoside; and PQQ, pyrroloquinoline quinone. [52]

2.3 Οικολογία και Επιδημιολογία

Διάφορα είδη *Klebsiella* απομονώνονται συχνά σε ποικιλία περιβαλλοντικών πηγών, όπως το έδαφος και το νερό, συμμετέχοντας σε βιοχημικές και γεωλογικές διεργασίες [61, 62]. Τα βακτήρια αυτά έχουν, επίσης, βρεθεί σε υδατικά περιβάλλοντα [63], δέντρα, φυτά, φρέσκα λαχανικά [64] και τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οξέα [65]. Σχετίζονται άμεσα με προϊόντα ξύλου [64]. Ως εκ τούτου, είδη *Klebsiella* απομονώνονται συχνά από τις ρινικές κοιλότητες ατόμων που εργάζονται σε βιομηχανίες επεξεργασίας ξύλου [66].

Είδη *Klebsiella* ανευρίσκονται σε ποικιλία θηλαστικών [67], αλλά και εντόμων [68] ως μέλη της φυσιολογικής τους χλωρίδας. Ωστόσο, αποτελούν και αίτια λοιμώξεων σε ζώα. Η *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί συχνή αιτία ενδομητρίτιδας σε άλογα και μαστίτιδας σε βοοειδή [69].

Η αλληλεπίδραση της *Klebsiella* με τον άνθρωπο περιλαμβάνει ποικιλία καταστάσεων, από ασυμπτωματική φορεία έως ευκαιριακές λοιμώξεις του νοσοκομειακού περιβάλλοντος [70] και λοιμώξεις της κοινότητας. Η φορεία αφορά κυρίως στον πεπτικό σωλήνα και λιγότερο συχνά τον ρινοφάρυγγα. Μία μελέτη της φορείας *Klebsiella* σε κατοίκους αστικών περιοχών (μη σχετιζόμενους με νοσοκομειακό περιβάλλον), νοσοκομειακό προσωπικό και πρόσφατα εισαχθέντες ασθενείς έδειξε ποσοστό φορείας 30-37 % [71]. Η φορεία σε ασθενείς με παρατεταμένη νοσηλεία κυμαινόταν γύρω στο 43% [71]. Άλλοι ερευνητές καταγράφουν υψηλά ποσοστά αποικισμού σε επαγγελματίες υγείας [72, 73]. Εκτός από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ασθενών και το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό, άλλες δεξαμενές που ευθύνονται για τη διασπορά του μικροβίου είναι ιατρικές

συσκευές, όργανα και παράγωγα αίματος που έχουν μολυνθεί εξαιτίας κακών συνθηκών υγιεινής.

Η *Klebsiella pneumoniae* χαρακτηρίζεται και ως «βάκιλλος του Friedländer» ή αίτιο της πνευμονίας Friedländer, μίας αναπνευστικής λοίμωξης της κοινότητας [74]. Ο καψιδικός τύπος K1 απομονώνεται συχνότερα σε αυτές τις περιπτώσεις [75]. Ωστόσο, η πνευμονία Friedländer φαίνεται να σπανίζει στον Δυτικό κόσμο [76]. Παράγοντες που προδιαθέτουν σε λοιμώξεις από *K. pneumoniae* και *K. oxytoca* περιλαμβάνουν τη μεγάλη ηλικία, το χρόνιο αλκοολισμό, το διαβήτη, χρόνιες καρδιολογικές, νεφρικές και αναπνευστικές παθήσεις, καθώς και νεοπλασματικές νόσους [77, 78]. Οι περισσότερες λοιμώξεις αποδίδονται στις *K. pneumoniae* και *K. oxytoca* [79, 80]. Οι *K. planticola* και *K. terrigena* ενοχοποιούνται εξαιρετικά σπάνια, πιθανά λόγω των δυσκολιών στην ταυτοποίησή τους [81], ενώ οι *K. pneumoniae ssp. rhinoscleromatis* [82] και *K. pneumoniae ssp. ozaenae* [83] σχετίζονται με ειδικές κλινικές καταστάσεις.

Είδη *Klebsiella* αναγνωρίζονται παγκοσμίως ως ευκαιριακά παθογόνα σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς [70]. Σχετίζονται, κατά κύριο λόγο, με λοιμώξεις του ουροποιητικού και αναπνευστικού σωλήνα, καθώς και με επιμολύνσεις τραυμάτων και λοιμώξεις μαλακών μορίων. Τέλος, μπορούν να οδηγήσουν σε θανατηφόρες μικροβιαμιές. Διαθέτουν εξαιρετική ικανότητα και ταχύτητα μετάδοσης σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας, καταλήγοντας συχνά σε επιδημικές εκρήξεις [70, 84]. Σχετικά πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την *K. pneumoniae* με χρόνια διάρροια σε HIV-θετικούς ασθενείς [85, 86].

2.4 Δομή και Αντιγονικά χαρακτηριστικά

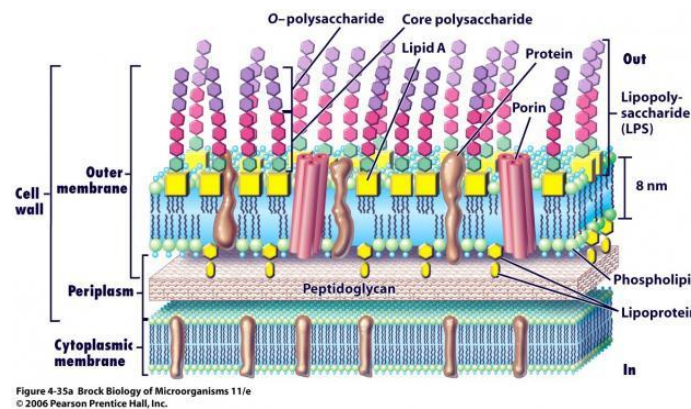
Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, ίσια, μήκους 1-2 μm . Μπορεί να παρατηρηθούν σε ζεύγη σαν διπλοβάκιλλος [51]. Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από μία εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη, τη στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης και από εξωτερική μεμβράνη αποτελούμενη από δύο διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων. Τα δομικά αυτά στοιχεία συνιστούν το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, εξωτερικά του οποίου βρίσκεται επιπλέον περίβλημα, το έλυτρο [87].

Η εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη περιβάλλει το κυτταρόπλασμα, το διαχωρίζει από το περιβάλλον και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ουσιών από και προς το κύτταρο. Η στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης είναι λεπτότερη στα Gram αρνητικά και αποτελείται από μονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος. Η εξωτερική μεμβράνη συνδέεται με το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης με λιποπρωτεΐνες και αποτελείται εσωτερικά από φωσφολιπίδια και εξωτερικά από λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Μεταξύ των μορίων αυτών παρεμβάλλονται διάφορες πρωτεΐνες. Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι συνδεδεμένοι στην εξωτερική μεμβράνη μέσω ενός μοναδικού μορίου που ονομάζεται λιπίδιο A. Ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το λιπίδιο A είναι ένα σάκχαρο με οκτώ άτομα άνθρακα που με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με μια αλυσίδα σακχάρων που σχηματίζουν το αντιγόνο O. Το λιπίδιο A είναι η περισσότερο διατηρημένη περιοχή των λιποπολυσακχαριτών και είναι υπεύθυνο για τη δράση ενδοτοξίνης του τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων [88].

Εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος παρατηρείται ένα σχετικά άμορφο στρώμα. Το στρώμα αυτό σχηματίζεται όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε

περιβάλλοντα πλούσια σε υδατάνθρακες. Όταν είναι πλήρως ενυδατωμένο και διακριτό στο οπτικό μικροσκόπιο, ονομάζεται έλυτρο ή κάψα. Ο ρόλος του ελύτρου συνίσταται στην προστασία από την φαγοκυττάρωση, τη δράση του συμπληρώματος και την εισβολή βακτηριοφάγων [89-91].

Τα κύρια αντιγόνα είναι το σωματικό O και το αντιγόνο K του ελύτρου. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 80 καψιδικά αντιγόνα (K). Πέντε διαφορετικά σωματικά αντιγόνα (O) απαντούν σε διάφορους συνδυασμούς με τα καψιδικά αντιγόνα. Έχει παρατηρηθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ αντιγονικής δομής και οικολογικής θέσης των βακτηρίων. Στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου, για παράδειγμα, απαντώνται κυρίως μέλη με καψιδικούς οροτύπους 1-6 [51, 70, 92-94].



Εικόνα 1 – Το περίβλημα των Gram αρνητικών βακτηρίων

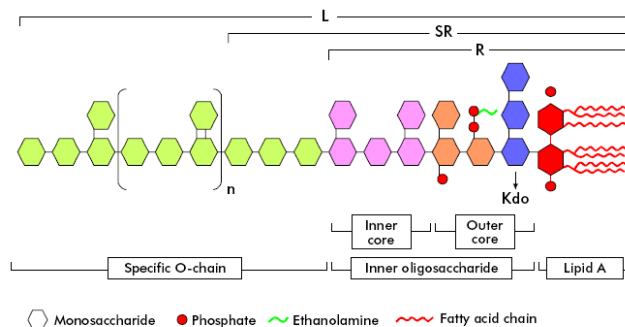


Figure 1. Scheme of the general chemical structure of bacterial lipopolysaccharides: Lipid A, internal oligosaccharide and specific O-chain. Rough type LPS (R) do not contain specific O-chain, semi-rough type (SR) just contain a repetitive unit of specific O-chain, and smooth type (S) contain two or more repetitive units of specific O-chain.

Εικόνα 2 – Η δομή του LPS

2.5 Λοιμώξεις και κλινικά σύνδρομα

2.5.1 *K. pneumoniae*

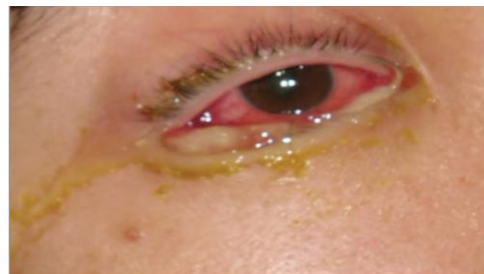
Οι προκαλούμενες από την *K.pneumoniae* λοιμώξεις αφορούν τόσο ασθενείς της κοινότητας, όσο και νοσοκομειακούς ασθενείς. Αποτελεί αίτιο πνευμονίας της κοινότητας, ενίοτε με χρόνιες, καταστροφικές βλάβες και σχηματισμό αποστημάτων στους πνεύμονες (πνευμονία Friedländer) [74, 95]. Μιμείται την πνευμονιοκοκκική πνευμονία, αλλά η νέκρωση του πνευμονικού παρεγχύματος είναι περισσότερο εκτεταμένη με σχηματισμό αποστημάτων. Προσβάλλει κυρίως χρόνιους αλκοολικούς, διαβητικούς και πάσχοντες από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Τα κρούσματα είναι σποραδικά. Σε πολλές περιπτώσεις συνυπάρχει βακτηριαιμία, με αποτέλεσμα υψηλή θνητότητα. Η κατάσταση αυτή σχετίζεται συχνότερα με τον καψιδικό τύπο K1. Η *K.pneumoniae* αποτελεί επίσης αίτιο ουρολοίμωξης σε ασθενείς της κοινότητας, με κοινά χαρακτηριστικά με τις ουρολοιμώξεις από άλλα ουροπαθογόνα [51].

Ωστόσο, μεγαλύτερη είναι η κλινική σημασία της *K.pneumoniae* ως νοσοκομειακού παθογόνου [70, 96]. Είναι υπεύθυνη για λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, λοιμώξεων των ουροφόρων και χοληφόρων οδών, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις σχετιζόμενες με καθετήρες και αγγειακές γραμμές και βακτηριαιμία [97]. Προδιαθεσικοί παράγοντες νοσοκομειακών λοιμώξεων από *K.pneumoniae* περιλαμβάνουν τις ακραίες ηλικίες, τον χρόνιο αλκοολισμό, το σακχαρώδη διαβήτη, άλλα χρόνια νοσήματα και νεοπλασίες [21].

Ο αποικισμός του γαστρεντερικού και αναπνευστικού σωλήνα με *K.pneumoniae*, πολλές φορές με πολυανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς

παράγοντες, είναι πολύ συχνό φαινόμενο σε νοσοκομειακούς ασθενείς. Ποικίλοι παράγοντες φαίνεται να σχετίζονται με τον αποικισμό από τέτοια στελέχη, όπως η ευρεία χρήση αντιβιοτικών και η παρατεταμένη νοσηλεία. Η φορεία από τέτοια στελέχη φαίνεται να προδιαθέτει σε νοσοκομειακές λοιμώξεις με καταστροφικές συχνά επιπτώσεις, λόγω της εξαιρετικής ικανότητας και ταχύτητας του βακτηρίου να μεταδίδεται μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών [11, 26].

Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, σε αντίθεση με την κλασσική *K.pneumoniae* (classic *K. pneumoniae* ή cKP), ένα νέο υπερλοιμογόνο στέλεχος (“hypervirulent” *K.pneumoniae* ή hvKP) έχει αναδειχτεί ως ένα ιδιαίτερα σημαντικό παθογόνο, προκαλώντας διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως ηπατικά αποστήματα, τόσο σε υγιείς όσο και σε ανοσοκατεσταλμένους [98]. Οι λοιμώξεις αυτές συχνά περιπλέκονται από την έντονη διεισδυτικότητα του παθογόνου παράγοντα, προκαλώντας για παράδειγμα ενδοφθαλμίτιδα και μηνιγγίτιδα [99]. Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ικανότητα διασποράς [99, 100]. Οι παράγοντες που ευθύνονται για την ιδιαίτερα μεγάλη λοιμογονικότητα της hvKP είναι μεγάλα πλασμίδια και μεταθετά στοιχεία, που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ελύτρου και αερομπακτίνης. Όμοια με την κλασσική *K.pneumoniae*, τα hvKP στελέχη εξελίσσονται σε πολυανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες βακτήρια, μέσω της απόκτησης γονιδίων αντοχής [101].



Εικόνα 3 – Θετικό “string test” και εικόνα ενδοφθαλμίτιδας από hvKP [99]

2.5.2 Λοιμώξεις από λοιπά είδη *Klebsiella*

Η *K. oxytoca*, όπως και η *K. pneumoniae*, προκαλεί πληθώρα νοσοκομειακών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις και η κλινική σημασία της *K. oxytoca* είναι ανάλογες αυτών της *K. pneumoniae* [80].

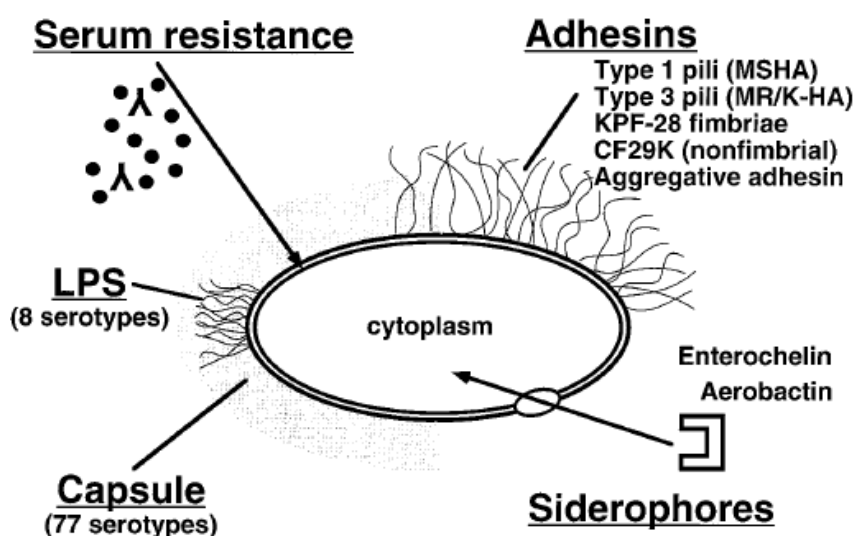
Η *K. ozaenae* σχετίζεται με τη χρόνια ατροφική ρινίτιδα που καλείται όζαινα και είναι μια σπάνια νόσος του ρινικού βλεννογόνου. Έχει απομονωθεί, επίσης, από αίμα, ούρα, λοιμώξεις μαλακών μορίων, λοιμώξεις του αναπνευστικού και μηνιγγίτιδες [83, 102].

Η *K. rhinoscleromatis* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του ρινοσκληρώματος. Αποτελεί μια χρόνια νόσο του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, που απαντάται σε υπανάπτυκτες περιοχές και σχετίζεται με συγχρωτισμό και κακές συνθήκες υγιεινής. Οι βλάβες συνίστανται σε κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις του υποβλεννογόνιου χιτώνα της μύτης, του λάρυγγα και του φάρυγγα και σπανιότερα της τραχείας [82].

Τα είδη *K. planticola* και *K. terrigena* βρίσκονται στο φυσικό περιβάλλον. Η απομόνωσή τους από τον άνθρωπο μπορεί να αποτελεί απλό αποικισμό και όχι αληθή λοίμωξη. Αντίθετα, η δυσκολία στην ταυτοποίησή τους πιθανά να οδηγεί σε υποεκτίμησή τους ως παθογόνα μικρόβια [81, 103]. Τέλος, η *K. ornithinolytica* απομονώνεται κυρίως από τραύματα [104, 105].

2.6 Παράγοντες λοιμογονικότητας

Τα ευκαιριακά και υποχρεωτικά παθογόνα μικρόβια εκφράζουν κάποιους παράγοντες λοιμογονικότητας (ή αγκρεσίνες), οι οποίοι διευκολύνουν την παθογόνο δράση τους, δηλαδή την ικανότητα πρόκλησης νόσου. Απαιτείται η παρουσία και έκφραση συνδυασμού παθογενετικών μηχανισμών για την εκδήλωση της παθογόνου δράσης των μικροβίων. Οι παράγοντες αυτοί κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικό DNA, πλασμίδια, βακτηριοφάγους και μεταθετά στοιχεία. Στόχος της ύπαρξής τους είναι η εγκατάσταση της λοίμωξης μέσω μίας σειράς βημάτων που περιλαμβάνουν τον αποικισμό κάποιας ανατομικής θέσης, τη διείσδυση στους ιστούς, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, την αποφυγή των αμυντικών μηχανισμών και, τέλος, την πρόκληση βλάβης ή δυσλειτουργίας του ξενιστή [106]. Τέσσερα συστατικά της *K.pneumoniae* εμπλέκονται στην παθογονικότητα του βακτηρίου: οι προσκολλητίνες, τα καμινδικά αντιγόνα, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα σιδηροφόρα [70, 107].



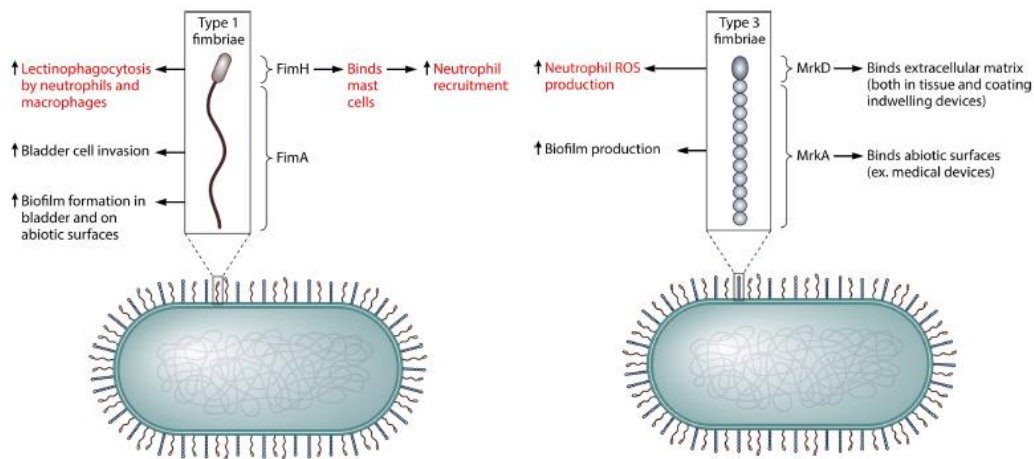
Εικόνα 4 – Παράγοντες λοιμογονικότητας της *Klebsiella* [70]

2.6.1 Προσκολλητίνες (adhesins)

Η προσκόλληση των βακτηρίων στις βλεννογονικές επιφάνειες του ξενιστή συνιστά την αρχική αλληλεπίδραση με αυτόν. Η προσκόλληση αυτή απαιτεί επιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας (συνήθως υδατανθράκων) και συνδετών (ligands) της βακτηριακής επιφάνειας (συνήθως πρωτεϊνών) και είναι ειδική. Οι προσκολλητίνες μπορεί να είναι και αιμοσυγκολλητίνες και συχνά εδράζονται σε κροσσούς (ινίδια, fimbriae ή pili).

Τα στελέχη *K.pneumoniae* παράγουν παχιά τύπου-1 ινίδια (Type 1 fimbriae), που σχετίζονται στενά με τα αντίστοιχα των άλλων Εντεροβακτηριακών. Περισσότερα από το 80% των στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώνονται από κλινικά δείγματα εκφράζουν τέτοια ινίδια [108, 109]. Τα ινίδια αυτά μεσολαβούν στη σύνδεση με ουροεπιθηλιακά κύτταρα και μετέχουν στην παθογένεια λοιμώξεων του κατώτερου και ανώτερου ουροποιητικού συστήματος [107, 110].

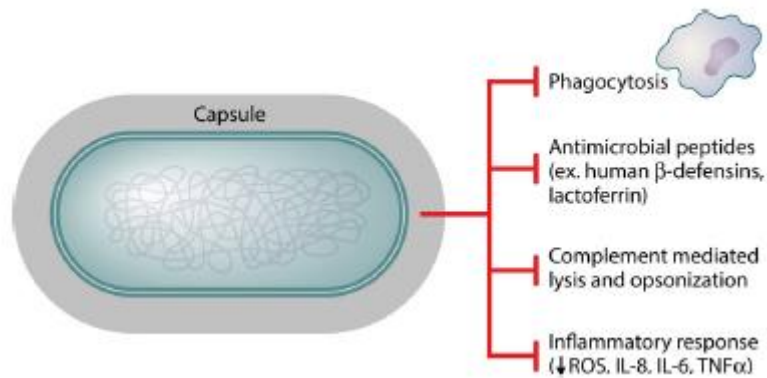
Στελέχη *K.pneumoniae* παράγουν, επίσης, λεπτά τύπου-3 ινίδια (Type 3 fimbriae), που χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά στη μαννόζη (mannose-resistant *Klebsiella*-like, MR/K) [109, 111]. Τα ινίδια αυτά είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση σε ενδοθήλια, κύτταρα της αναπνευστικής και ουροποιητικής οδού και στο κολλαγόνο τύπου V [112-114]. Τα ινίδια τύπου-3 έχουν πιθανά την ικανότητα αποικισμού ιατρικών συσκευών μέσω του σχηματισμού βιομεμβράνης [115, 116].



Εικόνα 5 – Ρόλος των προσκολλητινών στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae* [60]

2.6.2 Καψιδικά αντιγόνα

Το έλυτρο συνιστά τον πρώτο παράγοντα παθογονικότητας που περιγράφηκε στα είδη *Klebsiella*. Είναι ένα παχύ περίβλημα από υδρόφιλους πολυσακχαρίτες που αποτελούνται με τη σειρά τους από επαναλαμβανόμενες μονάδες τεσσάρων έως έξι σακχάρων. Έχουν αναγνωριστεί συνολικά 77 διακριτοί εξωπολυσακχαρίτες (αντιγόνα K) [93]. Τα αντιγόνα K παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της οψωνινοποίησης και φαγοκυττάρωσης, αποκλείοντας την εναπόθεση ή ενεργοποίηση του συμπληρώματος [117-119]. Διαφορές στη λοιμογόνο δύναμη έχουν αναγνωριστεί μεταξύ των διαφόρων οροτύπων, με τους τύπους K1 και K2 να αποτελούν τους περισσότερους λοιμογόνους [120]. Το περιεχόμενο σε μαννόζη φαίνεται να καθορίζει την λοιμογονικότητα των στελεχών. Οι χαμηλής λοιμογόνου δύναμης ορότυποι K7 και K21a έχουν συγκεκριμένες δομές μαννόζης, ενώ ο λοιμογόνος τύπος K2 περιέχει επίσης μαννόζη, διαφορετικής όμως διαμόρφωση [89, 118, 121]. Οι ορότυποι K1, K2 και K21 είναι οι συχνότερα απομονούμενοι τύποι σε διάφορες μελέτες [122-126].

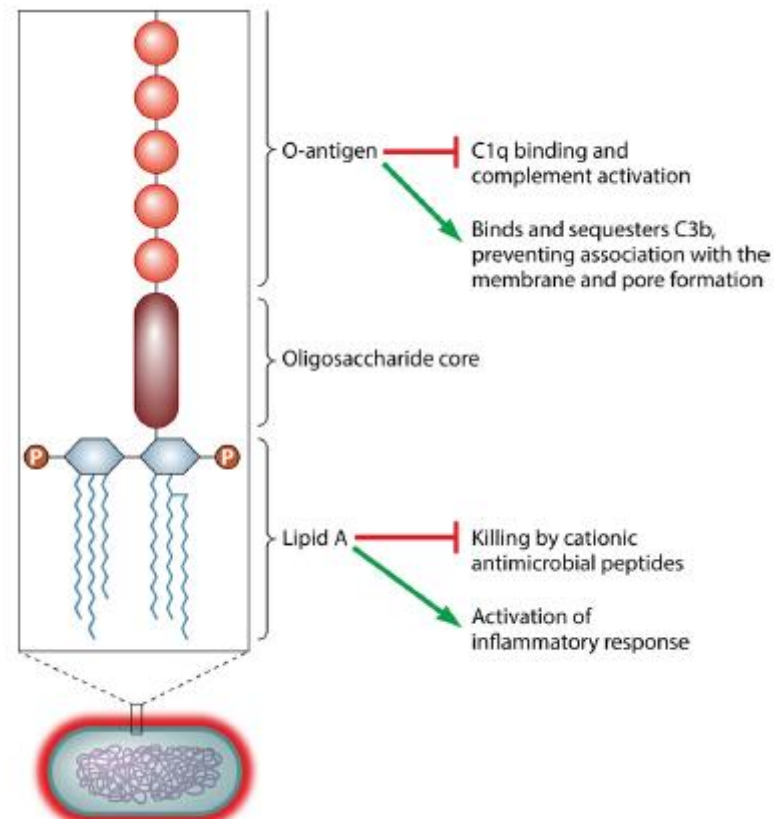


Εικόνα 5 – Ο ρόλος του ελύτρου στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae* [60]

2.6.3 Λιποπολυσακχαρίτες

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποτελεί απαραίτητο συστατικό της εξωτερικής επιφάνειας όλων των Gram αρνητικών βακτηρίων. Αναφέρεται και ως ενδοτοξίνη και αποτελείται από τρία τμήματα: το O-αντιγόνο, τον κεντρικό πολυσακχαριδικό πυρήνα και το λιπίδιο A [40].

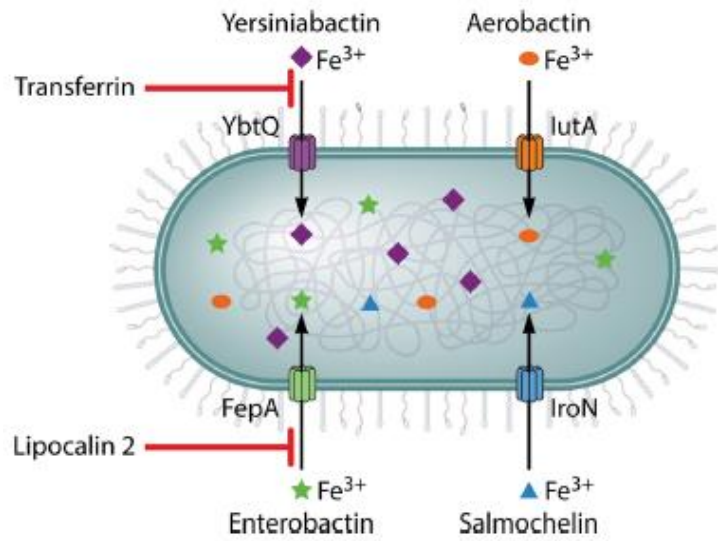
Εννέα O-αντιγόνα έχουν αναγνωριστεί στην *K.pneumoniae*, με το O1 να απαντά συχνότερα [127]. Ο βασικός ρόλος του O-αντιγόνου είναι η προστασία από τη διαμεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα βακτηριοκτόνο δράση του ορού [128]. Το C3b στοιχείο του συμπληρώματος εναποτίθεται στη βακτηριακή μεμβράνη, αλλά το σύμπλεγμα προσβολής της μεμβράνης αποτυγχάνει να θανατώσει τα κύτταρα, πιθανά εξαιτίας κάποιας στεροχημικής αλληλεπίδρασης της μακριάς O αλυσίδας [128-131]. Επιπλέον, το O5-αντιγόνο είναι εξίσου σημαντικό στην αντοχή στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού και σημαντικός παράγοντας προσκόλλησης στα ουροεπιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, το O1-αντιγόνο έχει συσχετιστεί με εκτεταμένη ιστική νέκρωση σε λοιμώξεις από *Klebsiella*.



Εικόνα 6 – Δομή και ρόλος του LPS στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae* [60]

2.6.4 Σιδηροφόρα

Ο σίδηρος είναι κριτικής σημασίας στοιχείο για τη βακτηριακή ανάπτυξη. Σε καταστάσεις ανεπάρκειας σιδήρου, τα Εντεροβακτηριακά παράγουν συστήματα υψηλής συγγένειας με στόχο τη διαλυτοποίηση και μεταφορά του απαιτούμενου σιδήρου. Τα συστήματα αυτά καλούνται σιδηροφόρα. Τα συχνότερα στην *K.pneumoniae* είναι η εντερομπακτίνη και η αερομπακτίνη, τα οποία με συναγωνιστικό τρόπο δεσμεύουν σίδηρο από τις σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες του ξενιστή, την τρανσφερρίνη και την λακτοφερρίνη [132].



Εικόνα 7 – Σιδηροφόρα και λοιμογόνος δράση της *K.pneumoniae* [60]

Διάφοροι άλλοι παράγοντες παθογονικότητας της *K.pneumoniae* έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνουν πορίνες, αντλίες εκροής, συστήματα μεταφοράς σιδήρου, αιμολυσίνες, ενδοτοξίνες και γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της αλλαντοΐνης [60, 70]. Ωστόσο, οι παράγοντες αυτοί δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί, ενώ ο ρόλος και ο μηχανισμός της δράσης τους δεν είναι επαρκώς διευκρινισμένοι.

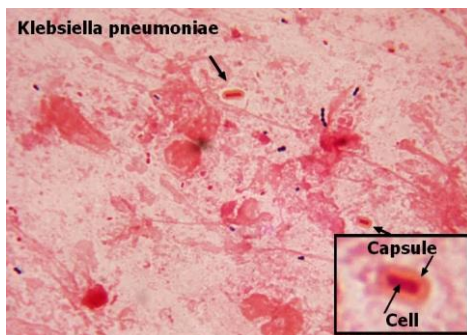
2.7 Εργαστηριακή διάγνωση

2.7.1 Συλλογή και μεταφορά δειγμάτων

Τα δείγματα που συλλέγονται είναι ούρα, αίμα, άκρα αγγειακών γραμμών, αναπνευστικές εκκρίσεις, υλικό τραυμάτων και αποστημάτων και άλλα κατά περίπτωση υλικά. Ισχύουν οι κανόνες λήψης και μεταφοράς που αφορούν το κάθε είδος κλινικού δείγματος.

2.7.2 Μικροσκοπική εξέταση κλινικού δείγματος

Στη μικροσκοπική εξέταση των φύσει στειρών δειγμάτων, η *Klebsiella* διακρίνεται ως κοντό, σχετικά παχύ Gram αρνητικό βακτηρίδιο που συχνά περιβάλλεται από έλυτρο.



Εικόνα 8 – *K.pneumoniae* σε Gram χρώση

2.7.3 Φαινοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης

Τα είδη *Klebsiella* αναπτύσσονται εύκολα και γρήγορα στα συνήθη θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των Εντεροβακτηριακών (π.χ. θρεπτικό άγαρ, αιματούχο άγαρ), αλλά και σε διαφοροποιητικά μέσα, όπως το MacConkey agar και το eosin-methylene blue agar (EMB). Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες είναι γκριζόλευκες, θολερές και βλενώδεις στα ελτροφόρα στελέχη. Στο MacConkey άγαρ είναι μεγάλες, ροζ ή κόκκινες αφού το βακτήριο διασπά τη λακτόζη και βλενώδεις επί παρουσίας ελύτρου.

Η ταυτοποίηση του γένους βασίζεται σε βιοχημικές ιδιότητες. Η θετική δοκιμασία Voges-Proskauer διαχωρίζει τη φυλή *Klebsiellae* από τα άλλα Εντεροβακτηριακά. Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *K.pneumoniae* είναι: παραγωγή αερίου από γλυκόζη, H₂S (-), IND (-), κίτρινα (+), φαινυλαλανίνη (-),

ουρία (+), κινητικότητα (-), ONPG (+). Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά για την ταυτοποίηση της *K.pneumoniae* και το διαχωρισμό των άλλων ειδών *Klebsiella* παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 9 - *K.pneumoniae* σε MacConkey agar

2.7.4 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης

Η ταυτοποίηση των ειδών *Klebsiella* μπορεί να επιτευχθεί με μοριακές μεθόδους, όπως η αλληλούχιση ιδιοσυστασιακών γονιδίων απαραίτητων για τη διατήρηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών (housekeeping genes), όπως τα γονίδια *gyrA*, *parC* [133] ή *rpoB* [134]. Μια απλοποιημένη μέθοδος που βασίζεται στην PCR-RFLP της *gyrA* έχει πρόσφατα αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους [135]. Επιπλέον, τα είδη *Klebsiella* μπορούν να ταυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας μεθοδολογίες, όπως η ριβοτυπία [133] ή η μεθοδολογία AFLP [136].

2.7.5 Τυποποίηση

Τα στελέχη των ειδών *Klebsiella* εμφανίζουν γενετική ετερογένεια και για το λόγο αυτό μία ποικιλία μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για το διαχωρισμό τους. Η βιοτυπία στηρίζεται στη χρησιμοποίηση βιοχημικών αντιδράσεων, όμως δεν βρίσκει σημαντική εφαρμογή στην τυποποίηση των στελεχών. Ωστόσο, η βιοτυπία βρίσκει σημαντική εφαρμογή σε επιδημιολογικές μελέτες σε συνδυασμό με την οροτυπία καψιδικών αντιγόνων [137]. Η οροτυπία βασίζεται στο χαρακτηρισμό των O και K-αντιγόνων. Η οροτυπία O-αντιγόνων είναι τεχνικά δύσκολη και θεωρείται λιγότερο χρήσιμη [93]. Αντίθετα, η τυποποίηση των K-αντιγόνων συνιστά μια από τις συνηθέστερες μεθόδους τυποποίησης στελεχών *Klebsiella* [138].

Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την τυποποίηση με τη χρήση βακτηριοφάγων [139] και την τυποποίηση των βακτηριοσινών που παράγουν τα βακτήρια [140]. Τέλος, οι μοριακές μέθοδοι στοχεύουν στην τυποποίηση βάσει διαφορών αλληλουχίας και οργάνωσης του γενωμικού DNA. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι MLST (Multilocus sequence typing) [141] και PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) [142-144]. Νεότερες μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί σχετιζόμενες με φασματομετρία μάζας (π.χ. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MALDI-TOF) [145, 146].

2.8 Γονιδίωμα

Η στενή γενετική συσχέτιση των μελών της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών διευκολύνει την μεταξύ των στελεχών και ειδών μεταφορά πλασμιδίων και μεταθετών στοιχείων, τα οποία συχνά αποτελούν φορείς γονιδίων

αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες [147]. Η γενετική ποικιλότητα μεταξύ των στελεχών της *K.pneumoniae* είναι χαρακτηριστική, με τα πλασμίδια – φορείς γονιδίων αντοχής να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλία [148-150]. Η *K.pneumoniae* παρουσιάζει, επιπλέον, σημαντική ικανότητα προσαρμογής στο περιβάλλον [151].

Υπάρχουν διαθέσιμα τα πλήρη γονιδιώματα τεσσάρων στελεχών *K.pneumoniae*. Το στέλεχος *K.pneumoniae* MGH 78578 (ATCC 700721) έχει απομονωθεί από πτύελα ασθενούς το 1994 και είναι ένα ιδιαίτερα λοιμογόνο στέλεχος και ανθεκτικό σε ποικιλία αντιβιοτικών (Genome Sequencing Center of Washington University [http://genome.wustl.edu/genomes/view/klebsiella_pneumoniae/]). Το στέλεχος NTUH-K2044 προέρχεται από ασθενή με ηπατικό απόστημα και είναι πολυευαίσθητο [149]. Το μέγεθος του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών κυμαίνεται από 5.1 έως 5.6 Mb. Επιπλέον, πέντε πλασμίδια έχουν ανιχνευτεί στο MGH 78578 στέλεχος με μεγέθη από 3.4 έως 175.9 kb, ενώ ένα ή δύο διαφορετικά πλασμίδια έχουν βρεθεί στα άλλα χαρακτηρισθέντα στελέχη [149, 151]. Η σύγκριση του γονιδιώματος της *K.pneumoniae* MGH 78578 με του *E.coli* K12 ταυτοποίησε 2.423 κοινά γονίδια με μέσο όρο νουκλεοτιδικής ομοιότητας 82 % [152].

3 Μικροβιακή αντοχή

Ως μικροβιακή αντοχή ορίζεται η κατάσταση όπου ένας μικροοργανισμός εμφανίζεται ανθεκτικός σε κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά του φάσματός του. Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι ενδογενής ή επίκτητη. Η ενδογενής αντοχή (intrinsic) είναι χαρακτηριστική του βακτηριακού είδους και χρησιμεύει συχνά στην ταυτοποίηση των μικροβίων. Η επίκτητη αντοχή (acquired) οφείλεται σε σημειακές

μεταλλάξεις του χρωμοσωμικού DNA ή σε απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλα στελέχη μικροβίων. Η ανάπτυξη της επίκτητης βακτηριακής αντοχής χρονολογείται από το 1940 και σχετίζεται με την ευρεία και συχνά αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών.

3.1 Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής

Η αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά επέρχεται κατόπιν μεταβολής του γενετικού υλικού. Η μεταβολή αυτή καλείται μετάλλαξη και μπορεί να γίνει είτε με αλλαγή του χρωμοσωμικού DNA του μικροβίου, είτε με την απόκτηση ξένου DNA μέσω ανταλλαγής γενετικού υλικού.

3.1.1 Μετάλλαξη χρωμοσωμικού DNA

Η μετάλλαξη του χρωμοσωμικού DNA συνίσταται στην τροποποίηση του γενετικού υλικού με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να καθίσταται ανθεκτικός στη δράση κάποιου αντιβιοτικού. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην μικροβιακή αντοχή είναι τυχαία γεγονότα που προκαλούνται από ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων. Είναι αρκετά σπάνια συμβάματα της τάξης του ενός ανά 10^6 κυτταρικές διαιρέσεις. Εάν μία τέτοια μεταλλαγή καταλήξει στην αντοχή του μικροβίου σε κάποιο αντιμικροβιακό παράγοντα, είναι πιθανό υπό την επίδραση των αντιβιοτικών να επικρατήσουν τα ανθεκτικά στελέχη με το φαινόμενο της επιλογής. Οι μεταλλαγές μπορεί να προκαλούν αντοχή σε έναν ή περισσότερους χημικά συγγενείς αντιμικροβιακούς παράγοντες ή σε αντιβιοτικά διαφορετικών χημικών ομάδων. Η αντοχή που προκύπτει είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου. Ο πολλαπλασιασμός και η

επικράτηση των ανθεκτικών στελεχών συντελείται κάτω από την πίεση που ασκούν τα χορηγούμενα αντιβιοτικά.

3.1.2 Μεταβίβαση γενετικού υλικού

Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να μεταβιβαστεί από έναν μικροοργανισμό σε άλλους που είναι αρχικά ευαίσθητοι με αποτέλεσμα οι τελευταίοι να καθίστανται ανθεκτικοί. Η μεταφορά των γονιδίων αντοχής αφορά το χρωμοσωμικό ή το πλασμιδιακό DNA και γίνεται μέσω τριών μηχανισμών μεταβίβασης: τη σύζευξη, τη μεταγωγή και τον μετασχηματισμό.

Βασικός μηχανισμός για την απόκτηση ξένων γονιδίων αντοχής είναι η βακτηριακή σύζευξη με μεταφορά συζευκτικών πλασμιδίων. Τα πλασμίδια αποτελούν ανεξάρτητη μονάδα DNA και βρίσκονται σε πολλά είδη μικροβίων. Είναι κυκλικά μόρια DNA, μικρού μοριακού βάρους και αποτελούν το 0.2 % του συνολικού γενετικού υλικού. Πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα ή ταυτόχρονα με το χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου. Έχει βρεθεί ότι σε πολλά πλασμίδια εδράζονται γονίδια αντοχής (πλασμίδια αντοχής, Resistance factors). Τα πλασμίδια μεταφέρονται συχνά με μεγάλη συχνότητα και διαθέτουν την ικανότητα ενσωμάτωσης στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Σε ορισμένα πλασμίδια τα γονίδια αντοχής σχηματίζουν αγκύλη που αποτελείται από συμπληρωματικές ανάστροφες αλληλουχίες DNA. Η αγκύλη είναι δυνατό να αποκοπεί και να μεταπηδήσει σε άλλο πλασμίδιο στο χρωμόσωμα. Τα γενετικά αυτά στοιχεία ονομάζονται μεταθετά στοιχεία.

Η μεταφορά γενετικού υλικού μπορεί να γίνει και με βακτηριοφάγους. Ο βακτηριοφάγος ενσωματώνεται σε ένα σημείο του χρωμοσώματος και όταν αποκολληθεί μπορεί να συμπαρασύρει ένα τμήμα, να εισέλθει σε άλλο κύτταρο και

να μεταφέρει το κομμάτι αυτό στο νέο ξενιστή. Πρόκειται για το φαινόμενο της μεταγωγής. Τέλος, η μεταμόρφωση αντιστοιχεί στη μεταφορά εξωγενούς χρωμοσωμικού DNA από ένα κύτταρο σε ένα άλλο μεταξύ συγγενών μικροοργανισμών.

3.2 Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής

Απαντούν τέσσερις βασικοί βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής: η αδρανοποίηση των αντιβιοτικών, η αλλαγή του βιολογικού στόχου, η μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα και οι αντλίες εκροής.

3.2.1 Αδρανοποίηση των αντιβιοτικών

Η παραγωγή ενζύμων, που διασπών ή τροποποιούν τα αντιβιοτικά, αποτελεί το συνηθέστερο μηχανισμό μικροβιακής αντοχής. Τα ένζυμα αυτά γενικά προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής. Μπορεί να είναι μη υδρολυτικά (π.χ. ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες) ή υδρολυτικά, όπως στην περίπτωση των β-λακταμασών που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Τα ένζυμα αυτά είναι συνήθως επίκτητα. Εντούτοις, ορισμένα απαντούν ενδογενώς σε βακτηριακά είδη, όπως οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες σε Gram αρνητικά βακτηρίδια. Η έκφραση αυτών των ενδογενών ενζύμων διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, εκτός αν παρουσιαστεί κάποια διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών έκφρασης.

3.2.2 Αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης

Στην περίπτωση αυτή σημειώνεται αλλαγή της διαμόρφωσης του στόχου των αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα ενώ αυτά συγκεντρώνονται στην ενεργό μορφή δεν μπορούν να δράσουν. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η αντοχή στις μακρολίδες λόγω μεταβολής της δομής των ριβοσωμάτων. Άλλο παράδειγμα είναι η τροποποίηση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (PBPs), σημαντικός μηχανισμός αντοχής στις β-λακτάμες στα Gram-θετικά βακτήρια.

3.2.3 Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα

Η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα συνίσταται στην ενίσχυση των φραγμών που πρέπει να ξεπεράσει το μικρόβιο προκειμένου να φτάσει στη θέση της βιολογικής του δράσης. Η μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε αλλαγές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών μικροβίων, όπως μειώσεις στις ποσότητες των πορινών, έχει καταγραφεί ως ένας σημαντικός παράγοντας αντοχής. Η αντοχή που οφείλεται σε μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου. Όταν, όμως, συνδυαστεί με άλλους μηχανισμούς αντοχής, όπως η παραγωγή ενζύμων ή η αλλαγή του στόχου, τότε μπορεί να προκύψει υψηλού επιπέδου μικροβιακή αντοχή.

3.2.4 Αντλίες εκροής

Αποτελούν αντλίες πρωτεϊνικής φύσης που απομακρύνουν ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά από το κύτταρο μετά την είσοδό τους σε αυτό. Έχουν περιγραφεί σε

Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Η πλειοψηφία των αντλιών αυτών βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χρησιμοποιούν κινητήρια δύναμη πρωτονίων για την αποβολή του φαρμάκου. Η μεταφορά των αντιβιοτικών γίνεται ενεργητικά. Οι αντλίες εκροής απαντούν σε μεγάλο βαθμό στην *Pseudomonas aeruginosa*, όπου η αυξημένη έκφραση καθιστά τα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

3.3 *Klebsiella* spp. και ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Τα στελέχη *Klebsiella* χαρακτηρίζονται από φυσική αντοχή στις αμινοπενικιλίνες (ampicillin και amoxicillin) και τις καρβοξυπενικιλίνες (carbenicillin και ticarcillin). Η αντοχή αυτή οφείλεται στη χαμηλού επιπέδου ιδιοσυστασιακή έκφραση μίας χρωμοσωμιακής β-λακταμάσης κλάσης A, που αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ. Οι στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες (cephalotin και cephalexin) μπορούν επίσης να αδρανοποιηθούν, αν και οι αντίστοιχες ελάχιστες ανασταλτικές πυκνότητες (MICs) είναι χαμηλές [153]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις χρωμοσωμικές β-λακταμάσες στην *K.pneumoniae* είναι γνωστά ως *blaSHV* and *blaLEN* [154-156].

Στην *K.pneumoniae* υψηλότερα και ευρύτερα επίπεδα αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι συνήθως αποτέλεσμα παραγωγής πλασμιδιακών ενζύμων, κυρίως της SHV1, και των ESBLs ενζύμων (Extended Spectrum Beta Lactamases). Τα στελέχη που παράγουν SHV1 παραμένουν ευαίσθητα στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς. Από τη δεκαετία του 1980, η εμφάνιση στελεχών *K. pneumoniae* και *K. oxytoca* ανθεκτικών σε κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς (κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη) και στην αζτρεονάμη παρατηρείται με αυξανόμενη συχνότητα

[157-159]. Η αντοχή αυτή διαμεσολαβείται από πλασμιδιακά ένζυμα με κυριότερα παραλλαγές της SHV1, τα TEM1 και TEM2 (από το όνομα του ασθενή Τεμονιέρα στον οποίο απομονώθηκαν για πρώτη φορά) [160].

Οι τύπου ESBL β-λακταμάσες ανευρίσκονται κυρίως σε στελέχη *K.pneumoniae* μεταξύ του γένους *Klebsiella*. Είναι πλασμιδιακά ένζυμα που υδρολύουν πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες όλων των γενεών και μονομπακτάμες και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό. Κλινικά σημαντικότερες στα Εντεροβακτηριακά είναι της τάξης A: TEM, SHV και CTX-M. Η πρώτη ESBL β-λακταμάση βρέθηκε σε στέλεχος *K.ozzaenae* στη Γερμανία το 1983 [161].

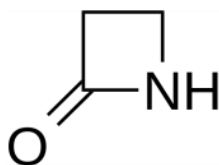
Ο νεότερος φαινότυπος αντοχής στα β-λακταμικά αποδίδεται σε ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενέμες και ονομάζονται καρβαπενεμάσες. Οι καρβαπενεμάσες είναι μέλη των μοριακών κλάσεων A, B και D, τα οποία έχουν την ικανότητα υδρόλυσης των καρβεπενεμών [6]. Ένζυμα κλάσης A ανιχνεύονται ήδη από τη δεκαετία του 1980 σε Εντεροβακτηριακά. Οι καρβαπενεμάσες κλάσης B (ή μεταλλοένζυμα) εμφανίζονται τη δεκαετία του 1990 αρχικά σε αζυμοτικά βακτήρια, ενώ το 2008 παρουσιάζεται ένα νέο ένζυμο της κατηγορίας αυτής. Τέλος, οι κλάσης D καρβαπενεμάσες ανιχνεύονται για πρώτη φορά στο Εδιμβούργο σε στέλεχος *Acinetobacter*. Ένζυμα αυτής της τάξης ανιχνεύονται πλέον και σε Εντεροβακτηριακά σε πολλές χώρες [6, 162-164].

Τα στελέχη *Klebsiella* παρουσιάζουν αντοχή και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών εκτός των β-λακταμικών. Διάφορα πλασμίδια μεταφέρουν ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες, ενώ συχνά φέρουν και γονίδια ESBL β-λακταμασών [165-167]. Έχει περιγραφεί, επίσης, μία συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής ESBL β-λακταμασών και της αντοχής στις κινολόνες [168, 169]. Η ανθεκτικότητα στις κινολόνες οφείλεται κατά κύριο λόγο σε χρωμοσωμικές

μεταλλάξεις των γονιδίων *gyrA* και *parC* [170, 171], ενώ μπορεί να κωδικοποιείται και από πλασμιδικά γονίδια αντοχής [172].

4 β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα περισσότερα βακτήρια διαθέτουν σταθερό κυτταρικό τοίχωμα. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί στόχο φαρμάκων που χαρακτηρίζονται από την εκλεκτική ικανότητα να αναστέλλουν τη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά ανήκουν σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων. Στη δομή τους διαθέτουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο. Οι ουσίες αυτές συνδέονται με πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο όριο κυτταρικού τοιχώματος και μεμβράνης και καλούνται πενικιλινοδεσμετικές πρωτεΐνες. Αυτές με τη σειρά τους εμπλέκονται στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και στη δημιουργία συνδέσεων μεταξύ των αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης, προσδίδοντας σταθερότητα στη δομή του τοιχώματος. Οι β-λακτάμες έχουν μεγάλο θεραπευτικό εύρος, αλλά και ποικιλία ανεπιθύμητων δράσεων. Περιλαμβάνουν τις εξής υποκατηγορίες: τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες, τις μονοπακτάμες, τις καρβαπενέμες και τους αναστολείς των β-λακταμασών.

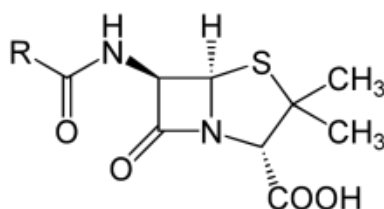


Εικόνα 10 – Ο β-λακταμικός δακτύλιος

4.1 Πενικιλίνες

Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming και έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Τα διάφορα είδη πενικιλινών αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο. Οι παραλλαγές της πλευρικής R αλυσίδας οδηγεί στα διαφορετικά μέλη της ομάδας. Οι βασικές ομάδες είναι οι εξής:

- i. Φυσικές πενικιλίνες: πενικιλίνη G, πενικιλίνη V, προκαϊνική πενικιλίνη και βενζαθινική πενικιλίνη
- ii. Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες: μεθικιλίνη, ναφκιλλίνη, οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη, δικλοξακιλλίνη και φλουκλοξακιλλίνη
- iii. Αμινοπενικιλίνες δραστικές έναντι Εντεροβακτηριακών: αμπικιλίνη και αμοξικιλίνη
- iv. Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες: καρβοξυπενικιλίνες, καρβενικιλίνη, τικαρκιλλίνη, ουρεΐδοπενικιλίνες, πιπερακιλλίνη, αζλοκιλλίνη και μεζλοκιλλίνη

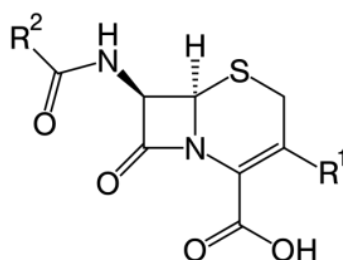


Εικόνα 11 – Η βασική δομή των πενικιλινών

4.2 Κεφαλοσπορίνες

Είναι ενώσεις συγγενείς με τις πενικιλίνες με τη διαφορά ότι ο β-λακταμικός δακτύλιος έχει συντακεί με εξαμελή δακτύλιο διυδροθειαζίνης. Προέρχονται από τον μύκητα *Acremonium*, παλαιότερα γνωστός ως *Cephalosporium*. Τα διάφορα μέλη της ομάδας προκύπτουν από την υποκατάσταση δύο πλευρικών αλυσίδων. Έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης από τις περισσότερες πενικιλίνες, με την εξαίρεση ότι δεν είναι δραστικές έναντι των εντεροκόκκων. Προκαλούν σπανιότερα αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Τα παράγωγα των κεφαλοσπορινών κατατάσσονται σε τέσσερις γενιές. Η πρώτη γενιά χαρακτηρίζεται από δράση έναντι Gram θετικών κόκκων, ενώ προχωρώντας προς τα νεότερα μέλη αυξάνεται η δραστικότητα έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων.

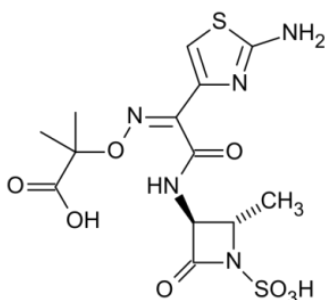
- i. Κεφαλοσπορίνες 1^{ης} γενιάς: κεφαλεξίνη, κεφαλοθίνη, κεφαζολίνη, κεφαδροξίλη
- ii. Κεφαλοσπορίνες 2^{ης} γενιάς: κεφακλόρη, κεφουροξίμη, κεφπροξίλη, κεφορανίδη
- iii. Κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς: κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη, κεφοτετάνη
- iv. Κεφαλοσπορίνες 4^{ης} γενιάς: κεφεπίμη, κεφπιρόμη



Εικόνα 12 – Η βασική δομή των κεφαλοσπορινών

4.3 Μονοπακτάμες

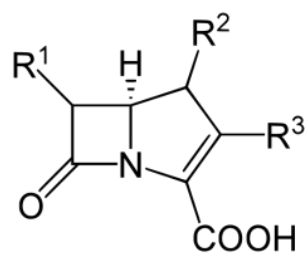
Πρόκειται για β-λακταμικά παράγωγα, όπου ο β-λακταμικός δακτύλιος δεν συνδέεται με άλλο δακτύλιο. Έχουν στενό αντιμικροβιακό φάσμα, μόνο έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων. Η μόνη διαθέσιμη μονοπακτάμη είναι η αζτρεονάμη.



Εικόνα 13 – Η χημική δομή της αζτρεονάμης

4.4 Καρβαπενέμες

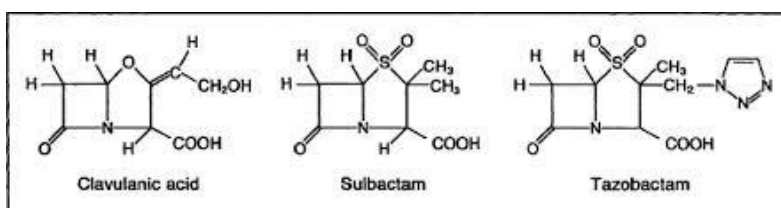
Διαθέτουν ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα δράσης, που περιλαμβάνει τα περισσότερα Gram θετικά και αρνητικά αερόβια και αναερόβια βακτήρια. Αναπτύχθηκαν από την καρβαπενέμη θειεναμυκίνη, παράγωγο του *Streptomyces cattleya*. Οι κυριότερες καρβαπενέμες περιλαμβάνουν την ιμепенέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη και δοριπενέμη. Η ιμепенέμη αδρανοποιείται από την δεϋδροπεπτιδάση του νεφρού, γι' αυτό χορηγείται σε συνδυασμό με έναν αναστολέα της δεϋδροπεπτιδάσης, τη σιλαστατίνη.



Εικόνα 14 – Η βασική δομή των καρβαπενεμών

4.5 Αναστολείς των β-λακταμασών

Οι αναστολείς των β-λακταμασών έχουν ελάχιστη αντιμικροβιακή δράση από μόνοι τους. Ωστόσο, αναστέλλουν τη δραστηριότητα των β-λακταμασών, μίας οικογένειας ενζύμων που διασπούν τον β-λακταμικό δακτύλιο και προσδίδουν αντιμικροβιακή αντοχή. Χορηγούνται, επομένως, σε συνδυασμό με άλλες β-λακτάμες, εμποδίζοντας τη δράση υδρολυτικών ενζύμων. Οι συνηθέστεροι παράγοντες είναι το κλαβουλανικό οξύ, η σουλμπακτάμη και η ταζομπακτάμη.



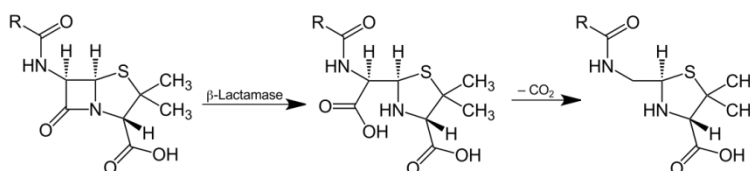
Εικόνα 15 – Οι αναστολείς των β-λακταμασών

5 Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Η ανάπτυξη βακτηριακής αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλεται: α) στην παραγωγή β-λακταμασών, που υδρολύουν το αντιβιοτικό, β) στην τροποποίηση των πενικιλλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs), γ) στην μειωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού μέσω απώλειας ή αλλαγής των πορινών και δ) στην ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού εκτός του βακτηριακού κυττάρου.

Η παραγωγή β-λακταμασών αποτελεί τον βασικότερο μηχανισμό αντοχής των Gram αρνητικών βακτηρίων στις β-λακτάμες. Το πρώτο πλασμιδιακό ένζυμο (TEM-1) εντοπίστηκε τη δεκαετία του 1960 σε στέλεχος *E.coli* σε Έλληνα ασθενή [173]. Ακολούθως, παρατηρήθηκε παγκόσμια διασπορά του συγκεκριμένου ενζύμου σε πολλά βακτηριακά είδη, καθώς και η εμφάνιση ολοένα και περισσότερων β-λακταμασών.

Οι β-λακταμάσες είναι μία ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών, οι οποίες αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντας τον καρβαμυδικό δεσμό $O=CN$ του β-λακταμικού δακτυλίου. Κωδικοποιούνται από χρωμόσωμα ή από πλασμίδια, μπορεί να είναι ενδογενείς ή επίκτητες, να παράγονται συνεχώς (ιδιοσυστασιακές) ή με επαγωγή (επαγωγίμες).



Εικόνα 16 – Ο μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών

5.1 Λειτουργική ταξινόμηση β-λακταμασών

Σύμφωνα με την αναθεωρημένη λειτουργική ταξινόμηση κατά Karen Bush και George A. Jacoby, οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε τρεις ομάδες [174]. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις κεφαλοσπορινάσες που ανήκουν στην μοριακή τάξη C. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις μοριακές τάξεις A και D. Σ' αυτήν ανήκουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες, ανθεκτικές στους αναστολείς και εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες τύπου σερίνης. Η τρίτη ομάδα αντιστοιχεί στις μεταλλο-β-λακταμάσες.

5.2 Μοριακή ταξινόμηση β-λακταμασών

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη ταξινόμηση των β-λακταμασών είναι η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler [175, 176]. Η μοριακή ταξινόμηση χωρίζει τις β-λακταμάσες σε 4 τάξεις (A, B, C, D) με βάση την ομολογία των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Ο Ambler διέκρινε δύο τάξεις, τις A και B, και προέβλεψε ότι θα επακολουθούσαν και άλλες. Ένα έτος αργότερα, το 1981, προσδιορίστηκε η τάξη C [177] και μερικά χρόνια μετά η τελευταία ομάδα (κλάση D) [178].

Στο ενεργό κέντρο του μορίου για τις τάξεις A, C και D υπάρχει εστέρας σερίνης, ενώ η τάξη B διαθέτει ιόντα δισθενούς μετάλλου (Zn). Οι τελευταίες χαρακτηρίζονται ως μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Η μοριακή κλάση A περιλαμβάνει πενικιλινάσες και κεφαλοσπορινάσες τύπου TEM και SHV, ευρέως και εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες και ένζυμα που υδρολύουν καρβαπενέμες. Η τάξη B αφορά στις μέταλλο-β-λακταμάσες που ανήκουν στις καρβαπενεμάσες. Η τάξη C αντιστοιχεί στις λεγόμενες 'Amp-C' β-λακταμάσες, που είναι κυρίως

χρωμοσωμιακά, αλλά και πλασμιδιακά ένζυμα. Η τελευταία τάξη β-λακταμασών σερίνης, γνωστές ως OXA β-λακταμάσες, βρέθηκαν να έχουν μικρή ομοιότητα με τα ένζυμα των τάξεων A και C και καθορίστηκαν ως τάξη D.

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ομάδων της λειτουργικής και μοριακής ταξινόμησης παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2- Ταξινόμηση των β-λακταμασών [174]

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino-β-lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino-β-lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino-β-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

6 Καρβαπενεμάσες

Η αντοχή των Gram αρνητικών βακτηρίων στις καρβαπενέμες οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υδρόλυση από τα ένζυμα καρβαπενεμάσες.

6.1 Ταξινόμηση καρβαπενεμασών

Οι καρβαπενεμάσες είναι μέλη των μοριακών κλάσεων A, B και D β-λακταμασών που διαθέτουν την ικανότητα διάσπασης των καρβαπενεμών.

Πίνακας 3 – Γενική ταξινόμηση καρβαπενεμασών [179]

Molecular class ^a (functional group ^b)	Enzymes	Inhibited by			Organisms	Gene location	Epidemiological relevance
		CLA	EDTA	ATM			
A (2f)	Sme-1 to Sme-3, IMI-1 to IMI-3, NmcA, SFC-1	±	–	R	<i>Serratia marcescens</i> and <i>Enterobacter cloacae</i>	Ch	±
	KPC-2 ^c to KPC-13	±	–	R	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	PI	++++
B (3)	GES-1 to GES-20	+	–	S/R	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	PI	+
	IMP-1 to IMP-33, VIM-1 to VIM-33, NDM-1 to NDM-6, SPM-1, SIM, GIM, IND-1 to IND-7, AIM, DIM, KHM	–	+	S	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and other GNNFB	PI/Ch	±/+++
D (2df) ^d	OXA-23 group (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24 group (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 group (OXA-40, OXA-143) OXA-58 OXA-48 group (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	±	– ^e	S	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	PI/Ch	++

ATM, aztreonam; Ch, chromosomal; CLA, clavulanate; GNNFB, gram-negative non fermentative bacilli; PI, plasmid; R, resistant; S, susceptible.
^aAmbler classification.
^bBush, Jacoby and Medeiros classification.
^cKPC-1 was later found to be identical to KPC-2.
^dOnly class D carbapenemases representative of different groups have been included.
^eSome OXA enzymes may be slightly inhibited by EDTA.

6.1.1 Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης A

Η κλάσης A καρβαπενεμάσες εμφανίστηκαν σε σποραδικά κλινικά δείγματα πριν από τριάντα περίπου χρόνια. Ανιχνεύθηκαν στα βακτήρια *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Klebsiella spp.* σε μεμονωμένες περιπτώσεις ή ως μικρές επιδημικές εκρήξεις [180, 181]. Τα βακτήρια που παράγουν τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία στην ιμιπενέμη (imipenem MICs ≤ 4 g/ml) έως πλήρη αντοχή. Υδρολύουν μια μεγάλη ποικιλία β-λακταμικών αντιβιοτικών και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη. Οι τρεις βασικές οικογένειες καρβαπενεμασών της μοριακής κλάσης A περιλαμβάνουν τα ένζυμα NMC/IMI, SME και KPC. Ο υδρολυτικός μηχανισμός τους απαιτεί την παρουσία

ενός ενεργού κέντρου σερίνης στη θέση 70 στο κατά Ambler σύστημα της Α κλάσης β-λακταμασών [182]. Διακρίνονται σε χρωμοσωμικά και πλασμιδιακά κωδικοποιούμενα ένζυμα.

Το πρώτο χρωμοσωμικό ένζυμο (SME-1, *Serratia marcescens* enzyme) ανιχνεύτηκε στην Αγγλία το 1982 [181, 183]. Ακολούθως, παρόμοια ένζυμα (SME-2 και 3) εμφανίστηκαν σποραδικά στις Η.Π.Α και αργότερα σε άλλες περιοχές [184-187]. Τα IMI (imipenem-hydrolyzing β-lactamase) και τα NCM-A (not metalloenzyme carbapenemase) έχουν ανιχνευτεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae* στις ΗΠΑ, τη Γαλλία και την Αργεντινή [188-190]. Τα IMI και τα NCM-A παρουσιάζουν 97% ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία και ταυτίζονται με το SME-1 κατά 70% περίπου [183, 190]. Όλα τα ανωτέρω χρωμοσωμικά ένζυμα υδρολύουν πενικιλίνες, πρώιμες κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και καρβαπενέμες. Διασπούν ανεπαρκώς την κεφοξιτίνη και τις ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες [186, 190, 191].

Οι πλασμιδιακές καρβαπενεμάσες περιλαμβάνουν τις KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) και GES (Guiana extended spectrum). Οι KPC βρέθηκαν αρχικά σε στελέχη *K.pneumoniae*. Πλέον ανιχνεύονται και σε άλλα Εντεροβακτηριακά, αλλά και σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* [192-194]. Διαφέρουν από τις χρωμοσωμικές στο ότι υδρολύουν τις ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες και στο ότι τα υπεύθυνα γονίδια εδράζονται σε μεγάλα μεταβιβάσιμα πλασμίδια. Η υδρόλυση αναστέλλεται παρουσία κλαβουλανικού και η έκφρασή τους δεν είναι επαγωγίμη. Έχουν περιγραφεί 13 ένζυμα τύπου KPC (KPC-1 έως 13). Το πρώτο μέλος KPC οικογένειας ανακαλύφθηκε σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* στη Βόρεια Καρολίνα το 1996 [195]. Ακολούθησαν αναφορές που οδήγησαν στην ανακάλυψη της KPC-2 κατά μήκος της ανατολικής ακτής των ΗΠΑ

[194, 196, 197]. Η KPC-2 προσδιορίστηκε ως αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στην KPC-1. Παράλληλα με την αύξηση των αναφορών για την KPC-2, μια παραλλαγή ενός μόνο αμινοξέος της KPC-2, η KPC-3, αναφέρθηκε από μία *K. pneumoniae* που προκάλεσε επιδημία από το 2000 έως 2001 στη Νέα Υόρκη [198]. Μετά τη μεγάλη διασπορά στις Η.Π.Α, στελέχη με KPCs απομονώθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο. Επίσης, έχει αναφερθεί και ο πρώτος εντοπισμός της KPC-2 σε πλασμίδιο στην *P. aeruginosa* [199].

Τα ένζυμα KPC διαθέτουν τα συντηρημένα μοτίβα του ενεργού κέντρου S-X-X-K, S-D-N, και K-T-G των β-λακταμασών της κλάσης A και έχουν την πλησιέστερη ομολογία αμινοξέων (~ 45%) με τις SME καρβαπενεμάσες. Έχουν τα συντηρημένα κατάλοιπα C69 και C238, τα οποία σχηματίζουν ένα δισουλφιδικό δεσμό που έχει περιγραφεί για τα ένζυμα SME και NMC/IMI. Οι KPC καρβαπενεμάσες υδρολύουν τις β-λακτάμες όλων των κλάσεων, με πιο αποτελεσματική υδρόλυση παρατηρημένη για τη νιτροσεφίνη, την κεφαλοθίνη, την κεφαλοριδίνη, τη βενζυλπενικιλίνη, την αμπικιλίνη, και την πιπερακιλλίνη. Διαθέτουν εξαιρετικά μεγάλη δυνατότητα για εξάπλωση λόγω της παρουσίας τους σε πλασμίδια, ειδικά μεταξύ στελεχών *K.pneumoniae*.

Τα ένζυμα της οικογένειας GES/IBC δεν απαντώνται συχνά. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 2000 σαν IBC-1 (integron-borne cephalosporinase) σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Ελλάδα [200] και σαν GES-1 (Guiana extended spectrum) σε *K. pneumoniae* από τη Γαλλική Γουιάνα [201]. Αργότερα, περιγράφηκε η GES-2 [202]. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον εννέα ποικιλίες. Εντοπίζονται συχνότερα σε στελέχη *P. aeruginosa*, αλλά και σε Εντεροβακτηριακά (*K. pneumoniae*, *E.coli*) σε Ελλάδα και άλλα μέρη του κόσμου [203-208]. Συνήθως πρόκειται για σποραδικά κρούσματα, ενώ σπάνια έχουν σημειωθεί μικρές επιδημίες

[208, 209]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα GES ένζυμα εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια πλασμιδίων. Αρχικά είχαν χαρακτηριστεί ως β-λακταμάσες [200]. Το 2001, όμως, το υδρολυτικό τους φάσμα συμπεριέλαβε την ιμιπενέμη με την αναφορά της GES-2 σε ένα πολυανθεκτικό στέλεχος *P. aeruginosa* [202].

6.1.2 Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης Β ή μεταλλο-β-λακταμάσες

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά με ένα μηχανισμό που βασίζεται στην αλληλεπίδραση με ιόντα ψευδαργύρου που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [210]. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) υδρολύουν αποτελεσματικά τις περισσότερες β-λακτάμες, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες. Είναι ανθεκτικές στην αδρανοποίηση από το κλαβουλανικό οξύ, την σουλβακτάμη και την ταζοβακτάμη. Η αζτρεονάμη δεν υδρολύεται. Διαιρούνται σε χρωμοσωμιακές και σε κωδικοποιούμενες από μεταβιβάσιμα γονίδια. Τα χρωμοσωμιακά ένζυμα βρίσκονται σε ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια του περιβάλλοντος και δεν συνδέονται με σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Αντίθετα, τα επίκτητα και μεταβιβάσιμα μεταλλοένζυμα παρουσιάζουν συνεχή εξάπλωση.

Οι MBLs διακρίνονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες (B1, B2 και B3). Στην κατηγορία B1 ανήκουν μεταξύ άλλων οι VIMs (Verona integrin-encoded MBL), IMPs (imipenemase) και NDMs (New Delhi MBL), οι οποίες αποτελούν τα πιο σημαντικά από κλινική άποψη ένζυμα. Η υποκατηγορία B2 απαριθμεί τα λιγότερα μέλη και περιλαμβάνει ένζυμα που παράγουν διάφορα είδη *Aeromonas* και *Serratia* [211-213]. Τέλος, η υποκατηγορία B3 περιλαμβάνει μεταξύ άλλων ένζυμα που παράγονται από την *Stenotrophomonas maltophilia* [214].

Τα μεταλλοένζυμα έχουν χαρακτηριστική στερεοδομή αβ/βα «σάντουιτς», με δύο β-πτυχωτές επιφάνειες στο κέντρο και πέντε α-έλικες στην επιφάνεια του μορίου. Η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο τμήματα που συνδέονται με μία αγκύλη αποτελούμενη από τα αμινοξικά κατάλοιπα 191-200. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει τα συντηρημένα κατάλοιπα His116-X-His118-X-Asp120 των προσδετών του ψευδαργύρου. Τα ένζυμα αυτά χρειάζονται ιόντα ψευδαργύρου για την καταλυτική τους δράση και αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες (π.χ. EDTA).

Οι IMP τύπου μεταλλο-β-λακταμάσες (Imipenemase metallo-β-lactamase) που έχουν ανιχνευτεί είναι περίπου είκοσι. Το πρώτο IMP-1 ένζυμο βρέθηκε στην *P. aeruginosa* από Ιάπωνες τη δεκαετία του 1990 [215]. Το πρώτο αυτό IMP-1 ένζυμο βρέθηκε αργότερα σε ιντεγκρόνια στη *S. marcescens* και σε άλλα Εντεροβακτηριακά στελέχη στην Ιαπωνία [216]. Το πρώτο ένζυμο αυτής της οικογένειας στην Ευρώπη ήταν IMP-2 και εντοπίστηκε σε στέλεχος *Acinetobacter baumannii* στην Ιταλία [217]. Οι IMP καρβαπενεμάσες διασπείρονται αργά σε χώρες της Άπω Ανατολής, έχουν όμως εντοπιστεί και σε Ευρώπη, Καναδά και Βραζιλία και πλέον έχουν λάβει παγκόσμιες διαστάσεις.

Η δεύτερη οικογένεια μεταλλο-β-λακταμασών που επικρατεί είναι τα VIM ένζυμα (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase). Κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία βρίσκονται σε γενετικά μεταθετά στοιχεία και γι' αυτό έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων, ακόμη και διαφορετικού γένους. Η οικογένεια απαριθμεί περίπου 14 μέλη. Το VIM-1 απομονώθηκε αρχικά στην Βερόνα το 1999 [218] και αμέσως μετά ανιχνεύτηκε το VIM-2 στη Γαλλία σε στελέχη *P. aeruginosa* [219]. Στη συνέχεια, περιγράφηκαν σε μία σειρά από Gram αρνητικά αζυμωτικά και σε Εντεροβακτηριακά είδη, όπως *E. coli*, *K. pneumoniae* και

E. cloacae, σε διάφορες χώρες του κόσμου μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα [220-222].

Η NDM μεταλλο-β-λακταμάση (New Delhi metallo-β-lactamase) αποτελεί το νεότερο μέλος της κατηγορίας των MBLs. Η NDM-1 απομονώθηκε για πρώτη φορά σε στέλεχος *K pneumoniae* σε νοσηλευόμενο ασθενή στο Νέο Δελχί της Ινδίας το 2008 [223]. Έκτοτε, η NDM-1 έχει βρεθεί σε στελέχη Εντεροβακτηριακών, *Acinetobacter* και *Pseudomonas* και έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά 24 παραλλαγές ενζύμων τύπου NDM. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν σχεδόν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά μαζί με τις καρβαπενέμες, αλλά όχι τις μονοπακτάμες [223, 224]. Επιπλέον, δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών. Τα NDM-θετικά μικροβιακά στελέχη είναι συνήθως ανθεκτικά και σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών λόγω της συνύπαρξης επιπρόσθετων μηχανισμών αντοχής [224]. Στις μέρες μας, τα NDM ένζυμα απαντώνται πλέον σε παγκόσμια κλίμακα [225, 226] και σχετίζονται με λοιμώξεις με αναφερόμενα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας [227].

6.1.3 Καρβαπενεμάσες μοριακής κλάσης D (OXA-τύπου καρβαπενεμάσες)

Οι OXA (oxacillin-hydrolyzing) β-λακταμάσες αντιπροσώπευαν την κύρια οικογένεια πλασμιδιακά κωδικοποιούμενων β-λακταμασών έως τις αρχές της δεκαετίας του 1980 [228-230]. Ταξινομήθηκαν στην μοριακή κλάση D και εντοπίζονταν κυρίως σε Εντεροβακτηριακά και σε στελέχη *P.aeruginosa* [231]. Γενικά, αναστέλλονταν πτωχά από το κλαβουλανικό οξύ και το EDTA και παρουσίαζαν ποικιλία στην αμινοξική τους αλληλουχία [232].

Υπάρχουν εννέα μείζονες υποομάδες OXA-τύπου καρβαπενεμασών [6]. Υδρολύουν ταχύτερα την οξακιλλίνη σε σχέση με τη πενικιλίνη. Το φάσμα υδρόλυσης ποικίλει. Γενικά, διασπούν τις πενικιλίνες και την κεφαλοθίνη, ενώ ελάχιστα ή καθόλου τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλονται ελάχιστα από τους αναστολείς των β-λακταμασών. Χαρακτηριστική είναι η αναστολή τους από το NaCl. Διακρίνονται από χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών (100-1000 φορές μικρότερη σε σχέση με τις μεταλλο-β-λακταμάσες). Η εισδοχή μιας αλληλουχίας ή η συνύπαρξη συστήματος ενεργητικής εκροής μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή στην ιμιπενέμη.

Η πρώτη OXA β-λακταμάση με δραστηριότητα καρβαπενεμάσης περιγράφηκε από τους Paton και συν. το 1993. Το ένζυμο αυτό (OXA-23) απομονώθηκε από ένα στέλεχος *A.baumannii* από έναν ασθενή από το Εδιμβούργο της Σκωτίας [233]. Αρχικά ονομάστηκε ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) και βρέθηκε ότι εδράζεται σε ένα μεγάλο πλασμίδιο [234]. Η πλειονότητα των OXA καρβαπενεμασών απαντούν στο ευκαιριακό παθογόνο *Acinetobacter spp.* Έκτοτε, η OXA-23 υπήρξε υπεύθυνη για επιδημίες από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Acinetobacter* στην Βραζιλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Κορέα και την Ταϊτή [235-238]. Οι OXA-24 και OXA-40 βρέθηκαν σε επιδημίες από *Acinetobacter* στην Ισπανία και την Πορτογαλία [239-241]. Η OXA-40 ήταν η πρώτη οξακιλλινάση με δράση καρβαπενεμάσης που περιγράφηκε στις ΗΠΑ [242]. Η OXA-58 έχει ανιχνευτεί σε στελέχη *Acinetobacter* σε πολλές χώρες και στην Ελλάδα [243].

Η OXA-48 ανιχνεύθηκε το 2001 σε πολυανθεκτικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* στην Τουρκία [244]. Πρόκειται για ένζυμο με μικρότερη του 50% αμινοξική ταυτότητα με τα άλλα OXA ένζυμα που εντοπίζεται σε ένα μεταβιβάσιμο πλασμίδιο. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν τις κυρίαρχες OXA-τύπου καρβαπενεμάσες

στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών [245]. Δεν έχουν ακόμα ανιχνευτεί σε στελέχη *Acinetobacter* ή *Pseudomonas*. Έχει αναγνωριστεί μία ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν για τα OXA-48-like ένζυμα με παγκόσμια εξάπλωση. Η OXA-48 προσφέρει αντίσταση στις πενικιλίνες (με εξαίρεση την πιπερακιλλίνη) και μειώνει την ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Η δράση της έναντι της μιπενέμης είναι δέκα φορές υψηλότερη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ένζυμα του *Acinetobacter spp.*

Πίνακας 4- OXA-τύπου καρβαπενεμάσες [6]

Cluster	Enzyme subfamily	Additional OXA member(s)
1	OXA-23 (ARI-1)	OXA-27, OXA-49
2	OXA-24	OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72
3	OXA-51	OXA-64 to OXA-71, OXA-75 to OXA-78, OXA-83, OXA-84, OXA-86 to OXA-89, OXA-91, OXA-92, OXA-94, OXA-95
4	OXA-58	None
5	OXA-55	OXA-SHE
6	OXA-48	OXA-54, OXA-SAR2
7	OXA-50	OXA-50a to OXA-50d, PoxB
8	OXA-60	OXA-60a to OXA-60d
9	OXA-62	None

Πίνακας 5-OXA-48 like ένζυμα [246]

β -Lactamase	Subgroup	First Report Host	Chromosome/Plasmid
OXA-48	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-54	OXA-54	<i>S. oneidensis</i>	Chromosome
OXA-162	OXA-48	<i>E. coli</i>	Plasmid
OXA-163	OXA-48	<i>E. cloacae</i>	Plasmid
OXA-181	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-199	OXA-48	<i>S. xiamenensis</i>	Chromosome
OXA-204	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-232	OXA-48	<i>E. coli</i>	Plasmid
OXA-244	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-245	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-247	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmid
OXA-370	OXA-48	<i>Enterobacter sp.</i>	-

6.2 Ανίχνευση καρβαπενεμασών

Η επιβεβαίωση της παραγωγής καρβαπενεμάσης από ένα μικροβιακό στέλεχος παρουσιάζει κλινικό και εργαστηριακό ενδιαφέρον. Ωστόσο, παραμένει δύσκολη η επιλογή των βακτηριακών στελεχών που θα εξεταστούν για την παραγωγή καρβαπενεμασών. Μία προσέγγιση βασίζεται στο επιδημιολογικό κατώφλι (epidemiological cutoff, ECOFF) της αντοχής. Οι προτεινόμενες τιμές MICs από το EUCAST για τα *E. coli* και *K. pneumoniae* είναι $\geq 1\mu\text{g/ml}$ για την ιμιπενέμη και $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ για την μεροπενέμη και την ερταπενέμη [247]. Με βάση το CLSI, που δεν έχει καθορίσει ECOFFs, η επιλογή των στελεχών για έλεγχο μπορεί να στηριχτεί σε κλινικά breakpoints. Συγκεκριμένα, στελέχη με ενδιαμέση ευαισθησία ή αντοχή σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη και σε μία κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενιάς θα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω. Η ερταπενέμη θεωρείται ο πιο ευαίσθητος δείκτης [248].

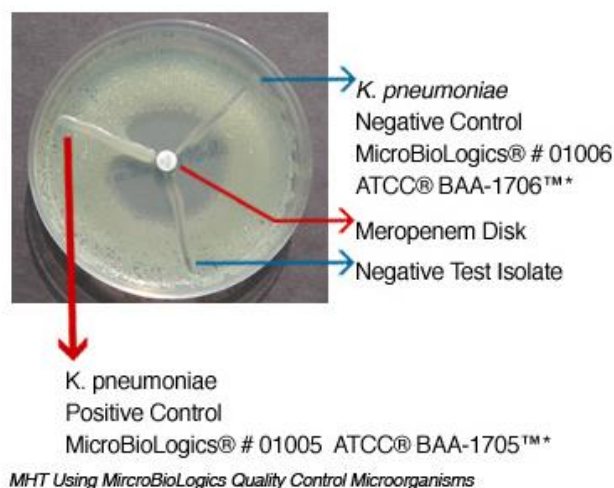
Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι ανίχνευσης καρβαπενεμασών που αφορούν κυρίως τα *E. coli* και *K. pneumoniae*. Παρακάτω γίνεται ανασκόπηση των μεθόδων αυτών.

6.2.1 Τροποποιημένο Hodge test (Modified Hodge Test, MHT)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην απενεργοποίηση της μεροπενέμης ή της ερταπενέμης από μικροοργανισμούς που παράγουν καρβαπενεμάση. Είναι η μόνη συνιστώμενη μέθοδος από το CLSI [249]. Με την δοκιμασία αυτή ανιχνεύονται όλες οι καρβαπενεμάσες. Πρότυπο στέλεχος *E. coli* (ATCC 25922) 0.5 McFarland επιστρώνεται σε Muller-Hinton άγαρ, ενώ στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος μεροπενέμης (10 μg) ή ερταπενέμης. Το υπό εξέταση στέλεχος επιστρώνεται

υπό μορφή λωρίδας από το δίσκο μέχρι το άκρο του τρυβλίου. Παραμόρφωση της ζώνης αναστολής γύρω από το εξεταζόμενο βακτήριο θεωρείται ενδεικτική παραγωγής καρβαπενεμάσης.

Η δοκιμασία αυτή έχει ορισμένες αδυναμίες. Δεν είναι δυνατή η διάκριση του τύπου της εμπλεκόμενης καρβαπενεμάσης. Επίσης, ψευδώς θετικά αποτελέσματα παρατηρούνται με στελέχη που παράγουν CTX-M-ESBLs ή αυξημένα ποσά AmpC β-λακταμασών [250, 251]. Ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει με Εντεροβακτηριακά στελέχη που παράγουν MBLs με χαμηλή δραστικότητα καρβαπενεμάσης [250]. Τέλος, το MHT πιθανά να είναι αναξιόπιστο στην ανίχνευση *K. pneumoniae* θετικών για NDM-1 [252, 253]. Το MHT παραμένει, παρ' όλα αυτά, μία απλή μεθοδολογία για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών σε συνδυασμό με κάποια επιπλέον δοκιμασία.

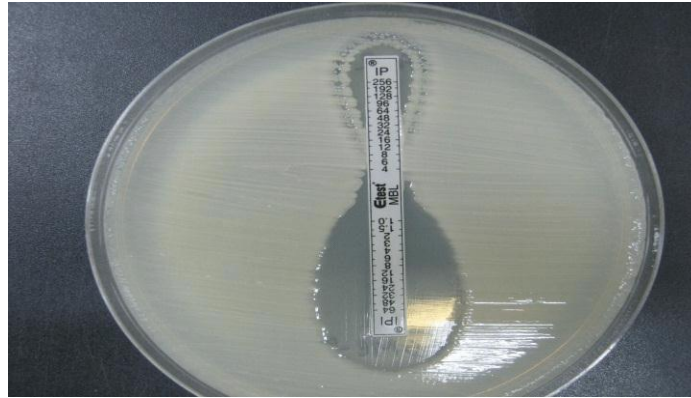


Εικόνα 17 - Τροποποιημένο Hodge test

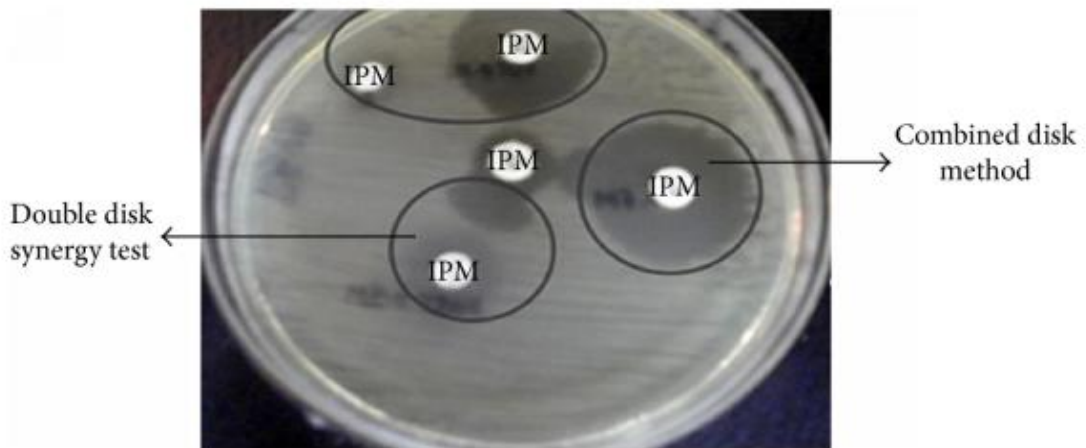
6.2.2 Ανίχνευση των MBLs με χηλικούς παράγοντες

Η φαινοτυπική ανίχνευση των MBLs στηρίζεται στην ειδική αναστολή τους κυρίως από το EDTA [254]. Ποικίλες τεχνικές έχουν χρησιμοποιήσει άλλους χηλικούς παράγοντες, όπως το διπυλονικό οξύ και thiol-ενώσεις (mercaptoethanol, mercaptopyruvic acid, mercaptoacetic acid) [250]. Οι παράγοντες αυτοί στερούν από το μόριο της MBL τα απαραίτητα ιόντα Zn και την καθιστούν ανενεργή. Οι συνήθεις δοκιμασίες που εφαρμόζονται είναι: α) το MBL E-test, β) η δοκιμασία συνέργειας με δύο δίσκους (double-disk synergy test, DDST) και γ) η δοκιμασία συνδυασμού του δίσκου με χηλικό παράγοντα (combined disk test, CDT). Στη δοκιμασία συνέργειας δίσκος μιπενέμης ή κεφταζιδίμης τοποθετείται σε απόσταση από δίσκο που περιέχει μόνο χηλική ουσία. Διεύρυνση της ζώνης αναστολής υποδηλώνει την παραγωγή MBL. Εναλλακτικά, ο δίσκος της β-λακτάμης συνδυάζεται με έναν αναστολέα και η διάμετρος αναστολής συγκρίνεται με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής της β-λακτάμης.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η υποκειμενικότητα της ερμηνείας και η αδυναμία ποσοτικοποίησης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το EDTA έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων με αποτέλεσμα ψευδώς θετική δοκιμασία. Το EDTA μπορεί επίσης να προκαλέσει υδρόλυση των αντιβιοτικών με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητική δοκιμασία. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές η ανίχνευση των MBLs με συνδυασμούς β-λακταμών με χηλικές ενώσεις αποδίδει καλά για *E. coli* και *K. pneumoniae*.



Εικόνα 18 – MBL E-test



Εικόνα 19 - Double-disk synergy test και Combined disk test για την ανίχνευση MBL

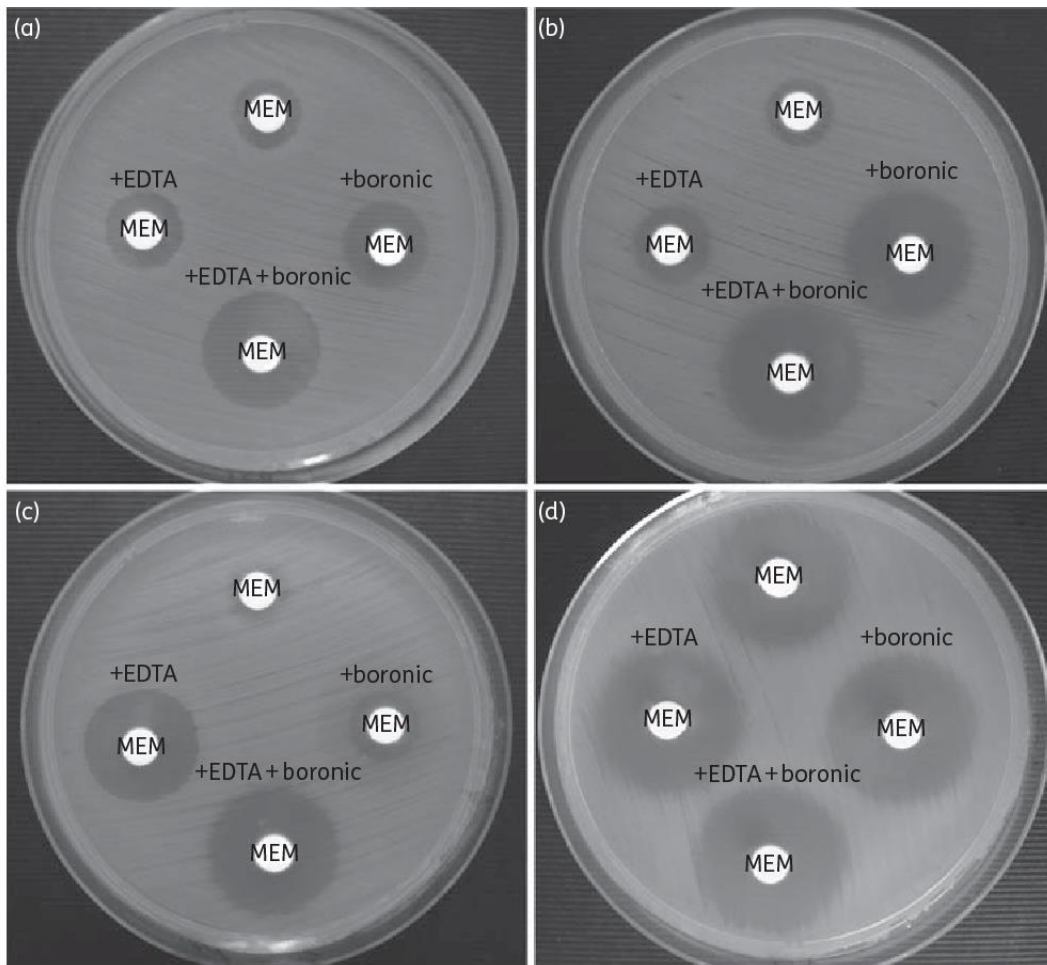
6.2.3 Ανίχνευση των KPCs με παράγωγα βορονικού οξέος

Οι KPCs αναστέλλονται από το βορονικό οξύ και τα παράγωγά του, τα οποία χρησιμοποιούνται σε δοκιμασίες συνέργειας ή συνδυασμού με δίσκους καρβαπενεμών. Ο δίσκος ερταπενέμης έχει προταθεί ως ο πλέον κατάλληλος για την ανίχνευση των KPCs σε Εντεροβακτηριακά.

Η ανίχνευση των KPC καρβαπενεμασών με τη χρήση του βορονικού οξέος περιορίζεται στην *K. pneumoniae*. Προβλήματα ειδικότητας προκύπτουν όταν τα

στελέχη παράγουν AmpC β-λακταμάσες, καθώς τα παράγωγα του βορονικού είναι ικανοί αναστολείς αυτών των ενζύμων. Η αδυναμία αυτή μπορεί να ξεπεραστεί μερικώς με την ταυτόχρονη χρήση της κλοξακιλλίνης, η οποία αναστέλλει εκλεκτικά τις κεφαλοσπορινάσες [255]. Επίσης, στην περίπτωση αυτή συνιστάται η χρήση βορονικού σε συνδυασμό με δίσκους ιμιπενέμης ή μεροπενέμης, αλλά όχι με ερταπενέμη.

Η ανίχνευση της ταυτόχρονης παραγωγής KPC και MBL από ένα βακτηριακό στέλεχος μπορεί να γίνει με την εφαρμογή της δοκιμασίας συνέργειας με συνδυασμούς δίσκων (combined-disc test). Η μεθοδολογία στηρίζεται στην χρησιμοποίηση ενός δίσκου καρβαπενέμης χωρίς αναστολέα και τριών δίσκων καρβαπενέμης εμπλουτισμένων με EDTA, βορονικό και συνδυασμό EDTA και βορονικού. Θεωρείται ότι το εξεταζόμενο στέλεχος παράγει και τους δύο τύπους ενζύμων όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο με το EDTA και το βορονικό είναι ≥ 5 mm σε σχέση με τους υπόλοιπους τρεις δίσκους.



Εικόνα 20 - Combined-disc test για την ανίχνευση KPC και MBL [256]

(a) Στέλεχος με παραγωγή KPC και VIM, (b) KPC(+) στέλεχος, (c) VIM(+) στέλεχος, (d) AmpC(+) στέλεχος

6.2.4 Ανίχνευση με τη χρήση χρωμογόνου θρεπτικού υλικού

Η παρουσία καρβαπενεμάσης σε κλινικά στελέχη μπορεί να αναδειχτεί με την χρήση ειδικών θρεπτικών υλικών που περιέχουν δείκτες. Τα διάφορα είδη διακρίνονται από το χρώμα των αποικιών. Η αξιοπιστία των μέσων αυτών δεν έχει ακόμη αξιολογηθεί επαρκώς. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε προγράμματα επιτήρησης σε διάφορες περιπτώσεις [257-259].

6.2.5 Μοριακή ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών

Η εφαρμογή μεθόδων που βασίζονται στην τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι ευρύτατα διαδεδομένη. Πολλαπλή (multiplex) και PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί [260-264]. Επιπρόσθετα, έχουν αναπτυχθεί kits που βασίζονται στην PCR και τον υβριδισμό. Η τεχνολογία των μικροσυτοιχιών (microarrays) έχει πρόσφατα προστεθεί στη λίστα των μοριακών μεθόδων [265, 266].

Οι μέθοδοι αυτοί επιτρέπουν την ανίχνευση των OXA-τύπου καρβαπενεμασών, για τις οποίες δεν έχει αναπτυχθεί κάποια φαινοτυπική δοκιμασία. Η real-time PCR επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση των παραλλαγών των γονιδίων των καρβαπενεμασών. Οι κατασκευαστές προτείνουν την εφαρμογή των μεθόδων αυτών απ' ευθείας σε κλινικά δείγματα, όμως η διαγνωστική χρησιμότητα πρέπει να εκτιμηθεί. Μία σημαντική αδυναμία των μοριακών μεθοδολογιών παραμένει ο περιορισμός της εφαρμογής για προκαθορισμένα γονίδια. Επομένως, είναι αδύνατο να αναδειχτούν νέοι τύποι γονιδίων καρβαπενεμασών με τέτοιες τεχνικές.

6.2.6 Ανίχνευση δραστηριότητας καρβαπενεμάσης με φασματοφωτομετρία και φασματομετρία μάζας

Η εκτίμηση της δραστηριότητας καρβαπενεμάσης με τη φασματοφωτομετρία γίνεται χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα ενζύμων και μία καρβαπενέμη. Θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την επιβεβαίωση της δραστηριότητας καρβαπενεμάσης. Η τεχνολογία MALDI-TOF φασματομετρία μάζας (Matrix-assisted laser desorption/ionization Mass Spectrometry) συνιστά το τελευταίο βήμα στην ανίχνευση

των καρβαπενεμασών [267, 268]. Πρόκειται για μεθόδους που περιορίζονται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και απαιτούν εμπειρία.

6.3 Επιδημιολογία καρβαπενεμασών

Η εξάπλωση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram (-) παθογόνων αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμια κλίμακα. Ειδικότερα, παρατηρείται επικράτηση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *Klebsiella pneumoniae* (CP-Kp).

Τα ένζυμα τύπου KPC είναι τα πιο διαδεδομένα μέλη της κλάσης A από την πρώτη τους περιγραφή στο νοτιοανατολικό τμήμα των Η.Π.Α. το 1996 [195]. Η επιδημική διασπορά των στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν KPCs έχει καταγραφεί σε Η.Π.Α., Κίνα, Ιταλία, Πολωνία, Ελλάδα, Ισραήλ, Βραζιλία, Αργεντινή, Κολομβία και Ταϊβάν [12]. Σποραδική παρουσία τους έχει αναφερθεί σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες (Ισπανία, Γαλλία, Γερμανία, Ιρλανδία, Βέλγιο κ.α.), στην Ασία (Ινδία, νότια Κορέα) και στην Αυστραλία [12, 269].

Στην Ελλάδα, στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν KPCs απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 2007 [270] και ο επιπολασμός τους σε ένα τεταρτοβάθμιο ελληνικό νοσοκομείο αυξήθηκε από 0% το 2003 σε 38,3% το 2010 [271]. Τα στελέχη αυτά έχουν διαδοθεί σχεδόν σε όλες τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) της Ελλάδας [272-275] και πλέον επηρεάζουν και ασθενείς σε παθολογικές και χειρουργικές κλινικές. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία διασποράς των στελεχών αυτών στην κοινότητα. Επιπλέον, διεθνής διασπορά στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν KPCs μέσω αποικισμένων ασθενών έχει επιβεβαιωθεί σε αρκετές περιπτώσεις [276]. Από την αρχή της επιδημίας έως και σήμερα, η πλειοψηφία των

KPCs απαντούν στον τύπο *K.pneumoniae* ST258 (sequence type), ο οποίος συνιστά ένα από τα πιο σοβαρά πολυανθεκτικά παθογόνα [277, 278].

Οι MBLs είναι από βιοχημικής άποψης πολύ διαφορετικές από τις KPCs και περιλαμβάνουν κυρίως τα IMP, VIM και NDM ένζυμα. Η αρχική απομόνωση του γονιδίου *bla*_{IMP-1} σε βακτήρια όπως η *Serratia marcescens* [254] και η *Klebsiella pneumoniae* [216] στην Ιαπωνία, και η επακόλουθη απομόνωση του IMP-2 στην Ιταλία [279] και του IMP-5 στην Πορτογαλία [280] σηματοδότησαν την απαρχή της διεθνούς διάδοσης των IMPs. Στις μέρες μας, 47 παραλλαγές των IMPs έχουν καταγραφεί σε 30 χώρες και αποτελούν τα επικρατέστερα MBL ένζυμα στην Ιαπωνία και σε περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας [281, 282].

Η δεύτερη σημαντική κατηγορία MBL ενζύμων, τα VIM, περιγράφησαν για πρώτη φορά στην Βερόνα της Ιταλίας το 1997 σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* [218] και στη συνέχεια εξαπλώθηκαν στα Εντεροβακτηριακά, κυρίως σε στελέχη *K. pneumoniae*. Τα VIM ένζυμα αποτελούν τα κυρίαρχα MBL ένζυμα στις χώρες της Μεσογείου, μεταξύ των οποίων η Ελλάδα και η Ιταλία, όπου είναι συχνά υπεύθυνα για νοσοκομειακές επιδημίες [6, 283, 284]. Τα VIM-1-like ένζυμα, και κυρίως τα VIM-4, είναι αυτά που καταγράφονται κατά κύριο λόγο σε Εντεροβακτηριακά [283, 284]. Πολλά από τα VIM-1/4 γονίδια ανευρίσκονται σε στελέχη *K. pneumoniae* (sequence type, ST, 147 and 11).

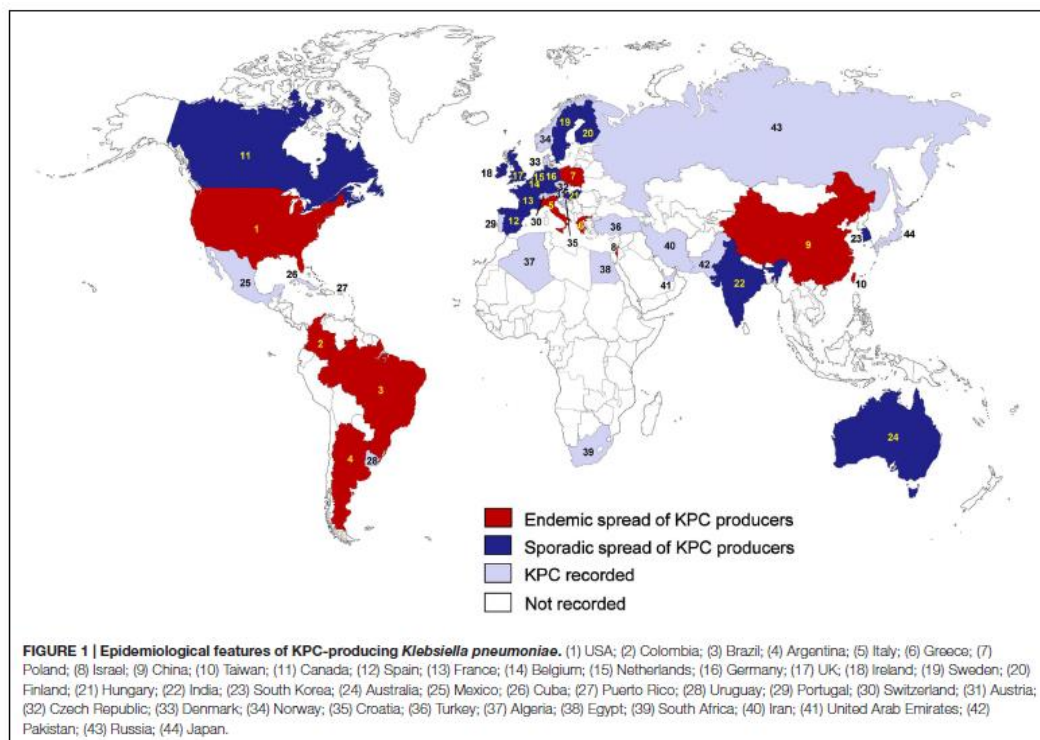
Από το 2008 στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν NDMs έχουν ταχύτατα διαδοθεί σε πολλές χώρες [285]. Η πρώτη αναφορά λοίμωξης από βακτήρια που παρήγαγαν NDM έγινε σε ασθενή από την Ινδία [223]. Σήμερα, τα NDMs ενδημούν σε χώρες της Ασίας, όπως η Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές [224]. Σποραδικές περιπτώσεις έχουν καταγραφεί στις ΗΠΑ, τον Καναδά, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Αγγλία, την Τουρκία και την Αυστραλία [286]. Στην χώρα μας, τα NDM

θετικά στελέχη έχουν αρχίσει να εντοπίζονται σε σποραδικό ακόμα επίπεδο [287, 288].

Η κλάση D καρβαπενεμάσες περιλαμβάνουν τις OXA-τύπου καρβαπενεμάσες. Η OXA-48 αποτελεί την περισσότερο διαδεδομένη [289]. Ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε στέλεχος *K. pneumoniae* στην Τουρκία το 2003 [244] και η χώρα αυτή παραμένει τη βασική πηγή στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν OXA-48 [269]. Έκτοτε, έχει καταγραφεί επιδημική διασπορά των OXA-48 σε χώρες όπως το Μαρόκο, η Λιβύη, η Αίγυπτος, η Ινδία και η Τυνησία. Σποραδική παρουσία αναφέρεται στη Γαλλία, την Ισπανία, το Βέλγιο, την Ολλανδία, τη Γερμανία και αλλού [286]. Στη χώρα μας υπάρχουν επίσης αναφορές για στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν OXA-48 [290].

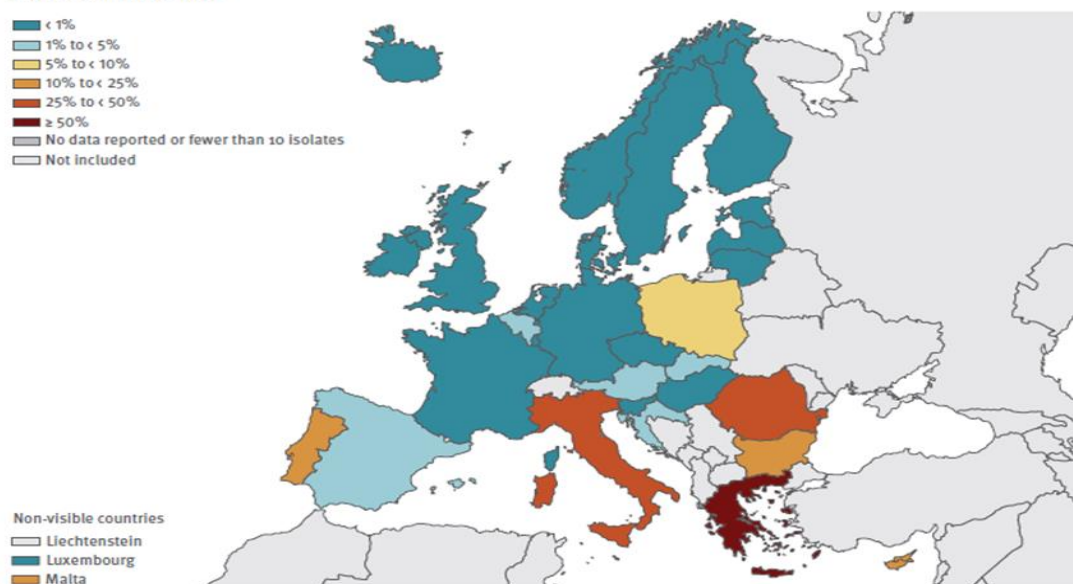
Πίνακας 6 – Η επιδημιολογία των καρβαπενεμασών στην *K. pneumoniae* [286]

Molecular class	Carbapenemase	Geographical distribution
A	SME types	Not found
	IMI types	Not found
	GES types	Greece (Vourli et al., 2004), Finland (Osterblad et al., 2012), Brazil (Picao et al., 2010), and South Korea (Jeong et al., 2005; Bae et al., 2007)
B	SFC-1, SHV-38, and NMC-A	France (Poirel et al., 2003) and Brazil (Tollentino et al., 2011)
	OXA-23, OXA-24/40, OXA-51, OXA-58, OXA-134, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229, and OXA-235	Not found
C	DHA-1	Taiwan (Lee et al., 2012b), South Korea (Park et al., 2013), and China (Hu et al., 2014)
	CMY-2 and CMY-10	China (Hu et al., 2014), Canada (Leung et al., 2012), and Greece (Pournaras et al., 2010b)
D	ADC-68	Not found
	IMP types	Malaysia (Hamzan et al., 2015), Taiwan (Tseng et al., 2015), China (Chen et al., 2015), Thailand (Rimrang et al., 2012), Ireland (Morris et al., 2016), Greece (Lascols et al., 2013), Spain (Lascols et al., 2013), Italy (Lascols et al., 2013), Turkey (Lascols et al., 2013), Austria (Zarfel et al., 2011), the USA (Limbago et al., 2011; Rojas et al., 2013), and Mexico (Gales et al., 2012)
	VIM types	Greece (Pournaras et al., 2010b), Ireland (Morris et al., 2016), Spain (Pena et al., 2014), Australia (Lascols et al., 2013), Croatia (Zujic Atalic et al., 2014), the Czech Republic (Hrabek et al., 2013b), Hungary (Melegh et al., 2014), Italy (Giani et al., 2013), Norway (Naseer et al., 2012), Austria (Zarfel et al., 2011), Finland (Osterblad et al., 2012), Germany (Steinmann et al., 2011), France (Birgy et al., 2011), China (Liu et al., 2015), India (Castanheira et al., 2011), Philippines (Lascols et al., 2013), Iran (Rajabnia et al., 2015), Taiwan (Tseng et al., 2015), Colombia (Rojas et al., 2013), Mexico (Gales et al., 2012), and Algeria (Rodriguez-Martinez et al., 2010)
	GIM-1, KHM-1, and SPM-1	Not found



Εικόνα 21 – Η παγκόσμια επιδημιολογία των KPC (+) στελεχών *K. pneumoniae* [286]

Figure 3.11. *Klebsiella pneumoniae*. Percentage (%) of invasive isolates with resistance to carbapenems, by country, EU/EEA countries, 2018



Εικόνα 22 – Η κατανομή των καρβαπενεμασών στην Ευρώπη [179]

7 Αποικισμός με CP-Kp στελέχη

7.1 Ορισμός αποικισμένου ασθενούς

Ως αποικισμένος ασθενής ορίζεται αυτός που νοσηλεύεται και εμφανίζει αποικισμό από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *K.pneumoniae* ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολαβήσει από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο μέχρι την απομόνωση του πολυανθεκτικού στελέχους από τις χλωρίδες του. Για τον ορισμό απαιτείται η συνύπαρξη των παρακάτω δύο κριτηρίων:

- Έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων συμβατών με λοίμωξη και
- Μικροβιολογική τεκμηρίωση με απομόνωση του πολυανθεκτικού μικροοργανισμού από χλωρίδες του ασθενούς ή από δείγματα που δεν στοιχειοθετούν λοίμωξη (πχ. ενδαγγειακοί καθετήρες, ουροκαθετήρες).

7.2 Ανατομικές θέσεις αποικισμού

Ο αποικισμός με CP-Kp στελέχη ανιχνεύεται κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα και αποτελεί βασικό βήμα πριν την εκδήλωση λοίμωξης [11, 291, 292]. Άλλες θέσεις αποικισμού περιλαμβάνουν τη βουβωνική χώρα, τις μασχάλες και το ανώτερο τμήμα της ράχης, το ουροποιητικό και το αναπνευστικό σύστημα [274, 293, 294]. Τέλος, ο συνηθέστερος συνδυασμός θέσεων αποικισμού αντιστοιχεί στο ορθό και τη βουβωνική περιοχή.

7.3 Παράγοντες κινδύνου

Ο αποικισμός με αυτούς τους μικροοργανισμούς έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία παραγόντων κινδύνου. Οι παράγοντες κινδύνου που περιγράφονται στη βιβλιογραφία πιθανά να διαφέρουν για τα διάφορα είδη Gram αρνητικών βακτηρίων και για το είδος του παραγόμενου ενζύμου [24, 274, 292, 295-297] . Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες από τις μελέτες που διερευνούν παράγοντες κινδύνου για αποικισμό είναι αναδρομικές, μελέτες ασθενών μαρτύρων και μελέτες κοορτής με μικρό μέγεθος δείγματος.

Οι παράγοντες κινδύνου που έχουν ανιχνευτεί στις διάφορες μελέτες περιλαμβάνουν τα ακόλουθα [11, 20, 23-26, 297, 298] :

- Προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών (κυρίως φθοριοκινολόνες, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες)
- Κακοήθη νοσήματα
- Πτωχές συνθήκες υγιεινής κατά τη νοσηλεία
- Μη χειρουργικές επεμβατικές διαδικασίες
- Παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας
- Νοσηλεία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ)
- Εισαγωγή σε μονάδα φροντίδας μετά από νοσηλεία σε ΜΕΘ
- Συννοσηλεία σε θάλαμο με γνωστούς φορείς
- Χρήση πανών
- Μηχανική υποστήριξη της αναπνοής
- Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
- Υψηλό Charlson score
- Διαμονή σε γηροκομείο

- Κλινοστατισμός
- Αποικισμός ή λοίμωξη με άλλα πολυανθεκτικά πλην των Εντεροβακτηριακών μικρόβια (πχ. *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*)
- Μεγάλη ηλικία
- Νευρολογικές παθήσεις
- Μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
- Παρουσία καθετήρα χοληφόρων αγγείων
- Παρουσία πολλαπλών επεμβατικών συσκευών
- Προηγούμενη χειρουργική επέμβαση
- Ύπαρξη τραυμάτων

Οι κυριότεροι αναφερόμενοι παράγοντες στις μελέτες αυτές περιλαμβάνουν την προγενέστερη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών, την παρατεταμένη νοσηλεία και τη νοσηλεία σε θάλαμο με γνωστούς φορείς ή σε ιδρύματα με υψηλά ποσοστά αποικισμένων ασθενών.

Πίνακας 7 – Παράγοντες κινδύνου για αποικισμό [298]

Prior exposure to or current use of antibiotics
 Use of a fluoroquinolone
 Malignancy
 Poor functional status
 Non-surgical invasive procedure
 Extended stay in hospital
 Admission to intensive-care unit
 Admission to post-acute-care units
 Sharing a room with a known carrier
 Diaper use

7.4 Διάρκεια αποικισμού

Δεδομένου ότι τα Εντεροβακτηριακά αποτελούν μέρος της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας, ο αποικισμός με CP-Kp μπορεί να επιμείνει για μεγάλο χρονικό

διάστημα. Ωστόσο, η εμπειρία και τα στοιχεία που διαθέτουμε είναι ανεπαρκή και οι μελέτες που έχουν προσεγγίσει το ζήτημα της διάρκειας του αποικισμού είναι λίγες. Με βάση την περιορισμένη εμπειρία μας, ο αποικισμός μπορεί να διαρκέσει τουλάχιστον μερικούς μήνες [295]. Παρατεταμένη διάρκεια φορέας καταλήγει σε μεγαλύτερη δεξαμενή των θετικών ασθενών και κατ' επέκταση σε υψηλότερα ποσοστά μετάδοσης μεταξύ των ασθενών.

7.5 Μηχανισμοί μετάδοσης

Η μετάδοση των πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών από ασθενή σε ασθενή αποτελεί τη συνηθέστερη θεωρούμενη οδό διάδοσης. Η θεώρηση αυτή βασίζεται στην υπόθεση ότι οι αποικισμένοι ασθενείς αποτελούν τη μοναδική δεξαμενή φορέων. Ωστόσο, ενδιάμεσοι μεσολαβητές της διασποράς περιλαμβάνουν τα μολυσμένα χέρια του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού, το περιβάλλον και τους επισκέπτες των ασθενών και θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στις προσπάθειες ελέγχου των πολυανθεκτικών νοσοκομειακών παθογόνων [14].

Ειδικότερα για την *K.pneumoniae*, μελέτες δείχνουν την σαφή τάση του οργανισμού αυτού να εξαπλώνεται στα νοσηλευτικά ιδρύματα και να προκαλεί νοσοκομειακές επιδημίες [70, 299]. Η μετάδοση μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας φαίνεται να αποτελεί τη σημαντικότερη οδό διασποράς των CP-Kp στελεχών [299]. Η διασπορά αυτή οφείλεται κυρίως στη μόλυνση των χεριών κατά την επαφή με ήδη αποικισμένους ασθενείς, αλλά και με περιβαλλοντικές πηγές μόλυνσης [13, 300-305]. Σε μια πρόσφατη έρευνα περιγράφεται επιδημία από μολυσμένο φαγητό, υποδηλώνοντας τη δυνατότητα διασποράς μέσω της τροφικής αλυσίδας [306].

8 Λοιμώξεις από CP-Kp στελέχη

8.1 Ορισμός CP-Kp λοίμωξης

Ως κρούσμα ασθενούς με λοίμωξη ορίζεται ασθενής που νοσηλεύεται και εμφανίζει κλινική λοίμωξη μικροβιολογικά τεκμηριωμένη από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *K.pneumoniae*, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολαβήσει από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο μέχρι την έναρξη των συμπτωμάτων της λοίμωξης ή την απομόνωση του λοιμογόνου παράγοντα. Για τον ορισμό απαιτείται η συνύπαρξη των παρακάτω δύο κριτηρίων:

- Κλινική εικόνα συμβατή με λοίμωξη και
- Μικροβιολογική τεκμηρίωση της λοίμωξης με απομόνωση του υπεύθυνου μικροοργανισμού από την ανατομική θέση της λοίμωξης.

8.2 Είδη λοιμώξεων

Οι λοιμώξεις που προκαλούν τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά βακτήρια, μεταξύ των οποίων και η *K.pneumoniae*, ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν βακτηραιμίες, πρωτοπαθείς ή σχετιζόμενες με ενδαγγειακούς καθετήρες [9, 21, 307], και νοσοκομειακές πνευμονίες, συμπεριλαμβανομένων των περιπτώσεων που σχετίζονται με τον αναπνευστήρα [294, 307, 308]. Άλλες λοιμώξεις είναι οι λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου και οι λοιμώξεις τραυμάτων [307, 309], η περιτονίτιδα [307], η ενδοκαρδίτιδα [310], η μεσοθωρακίτιδα [311] και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος [307].

8.3 Παράγοντες κινδύνου

Οι λοιμώξεις από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία παραγόντων κινδύνου. Βασικοί παράγοντες κινδύνου αναδεικνύονται η προχωρημένη ηλικία, η παρουσία σοβαρού υποκείμενου νοσήματος με υψηλό APACHE-II score και η μηχανική υποστήριξη της αναπνοής [10, 21, 22]. Άλλοι παράγοντες περιλαμβάνουν τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και την παρατεταμένη νοσηλεία [10, 312]. Η προηγούμενη κατανάλωση αντιβιοτικών (καρβαπενέμες, κινολόνες, αναστολείς β-λακταμασών, κεφαλοσπορίνες και γλυκοπεπτίδια) αναδεικνύεται σχεδόν σε όλες τις μελέτες ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου υπεύθυνος για λοιμώξεις από τέτοια βακτήρια [10, 21, 22, 311, 313, 314]. Επιπλέον παράγοντες κινδύνου αναφέρονται η παρουσία πολλαπλών τραυμάτων και η εισαγωγή σε ΜΕΘ (Μονάδα Εντατικής Θεραπείας) [22, 220, 314]. Οι Φαλάγγας και συνεργάτες καταδεικνύουν ως άλλους σημαντικούς παράγοντες τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, την παρουσία τραχειοστομίας και τις χειρουργικές επεμβάσεις με παρουσία ξένων σωμάτων [22].

Τέλος, η μετα-ανάλυση που δημοσιεύθηκε το 2019 από τους Pin Liu και συνεργάτες χρησιμοποίησε τα δεδομένα από 16 μελέτες με συνολικό αριθμό 3.627 συμμετεχόντων προκειμένου να αναδείξει παράγοντες κινδύνου για λοιμώξεις από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *Klebsiella pneumoniae* [315]. Οι παράγοντες που ανέδειξε η συγκεκριμένη μετα-ανάλυση περιλαμβάνουν την παρατεταμένη νοσηλεία, την εισαγωγή σε ΜΕΘ, οι προηγούμενες νοσηλείες, η μεταμόσχευση οργάνων, η χρήση στεροειδών, η παρουσία κεντρικών φλεβικών γραμμών, η παρουσία τραχειοστομίας και παρεντερικής διατροφής και η έκθεση σε αντιβιοτικά. Στον ακόλουθο πίνακα συνοψίζονται τα ευρήματα της ανωτέρω μετα-ανάλυσης.

Πίνακας 8 – Παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από CP-Kp [315]

Risk factor	OR [95% CI]	P _e (%)	PARP (%)
Previous antibiotic use	3.31 [1.68–6.49]	71.89	62.42
CVC use	2.30 [1.26–4.19]	52.07	40.37
MV	2.54 [1.67–3.85]	34.29	34.56
Carbapenems	4.01 [2.59–6.21]	17.47	34.46
Prior hospitalization	1.85 [1.12–3.07]	44.59	27.48
Tracheostomy	3.63 [1.47–9.00]	12.73	25.08
Admission to ICU	2.48 [1.90–3.23]	22.56	25.03
Anti-pseudomonal penicillins	2.67 [1.78–4.01]	19.75	24.80
Quinolones	2.28 [1.40–3.70]	24.50	23.87
Parenteral nutrition	2.38 [1.68–3.36]	17.13	19.12
Glycopeptides	2.40 [1.09–5.27]	15.71	18.03
Steroid use	1.43 [1.04–1.96]	22.35	8.77
Transplant recipient	2.01 [1.03–3.92]	8.49	7.90
Aminoglycosides	2.05 [1.43–2.94]	8.10	7.84

P_e, pool exposure rate; PARP, population attributable risk proportion.

8.4 Έκβαση CP-Kp λοιμώξεων

Η κλινική εμπειρία για την έκβαση των CP-Kp λοιμώξεων περιορίζεται σε μελέτες τύπου case-report, αναδρομικές μελέτες και προοπτικές μελέτες παρατήρησης. Υψηλά ποσοστά θνησιμότητας καταγράφονται σε ασθενείς με λοιμώξεις από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά στελέχη. Η αποδοτέα θνησιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 51.2% και 95% για λοιμώξεις από ανθεκτική στις καρβαπενέμες *P. aeruginosa* [316, 317] και μεταξύ 18.9% και 48.0% για λοιμώξεις οφειλόμενες σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά [9, 10, 274]. Η αναφερόμενη θνησιμότητα για λοιμώξεις από MBL Εντεροβακτηριακά στελέχη κυμαίνεται από 18.8% έως 66.7%. Αντίστοιχα, υψηλά είναι τα ποσοστά θνησιμότητας (24% έως 65%) σε ασθενείς με CP-Kp λοίμωξη [318].

Οι Daikos et al. κατέγραψαν στατιστικά υψηλότερη θνησιμότητα σε ασθενείς με λοίμωξη από VIM-1 *K.pneumoniae* (VPKP) με αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC >4 mg/L) σε σχέση με ασθενείς με VPKP λοίμωξη με ευαισθησία στις καρβαπενέμες

(MIC <4 mg/L) ή με μη VPKP στελέχη [9]. Η επίδραση της αντοχής στις καρβαπενέμες στη θνησιμότητα σχετίζεται πιθανά με την αποτυχία παροχής αποτελεσματικής αντιμικροβιακής αγωγής, ενώ η παραγωγή του VIM ενζύμου δεν είχε καμία επίπτωση στη θνησιμότητα. Οι Patel et al. αναφέρουν ότι οι ασθενείς με λοίμωξη από ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K.pneumoniae* (CRKP) πέθαιναν συχνότερα κατά τη νοσηλεία τους σε σχέση με τους ασθενείς με λοίμωξη από ευαίσθητα στελέχη (48% vs. 20% αντίστοιχα, $p < 0.001$) [10]. Οι Schwaber et al. κατέληξαν στο ότι η απομόνωση ανθεκτικού στελέχους στις καρβαπενέμες *K.pneumoniae* μπορούσε να προβλέψει σημαντικά το θάνατο σε έρευνα με ασθενείς με CRKP λοίμωξη, ασθενείς με λοίμωξη από ευαίσθητα στελέχη και με ομάδα ελέγχου ασθενείς χωρίς λοίμωξη [11].

Διάφοροι προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου για θνησιμότητα από τέτοιου είδους λοιμώξεις έχουν προσδιοριστεί. Οι παράγοντες κινδύνου για θνησιμότητα από Gram αρνητικά βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες περιλαμβάνουν τη μεγάλη ηλικία, τις σοβαρές υποκείμενες παθήσεις, την κακοήθεια, το μηχανικό αερισμό, τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, τη σήψη και το σηπτικό shock, την αντοχή στις καρβαπενέμες, την χορήγηση ακατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής, τη μικρότερη των 72 ωρών κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή και την μη εκρίζωση του υπεύθυνου παθογόνου εντός επτά ημερών [9-11, 250, 274, 312, 319].

Πίνακας 9- Παράγοντες κινδύνου για θνησιμότητα σε ασθενείς με λοίμωξη από CPE [298]

Older age
Severity of underlying disease
Malignancy
Mechanical ventilation
Solid organ transplantation
Severe sepsis and/or septic shock
Carbapenem resistance
Inappropriate antibiotic therapy
Short duration (≤ 72 h) of appropriate antibiotic therapy
Lack of microbiological eradication at 7 days

8.5 Θεραπεία CP-Κρ λοιμώξεων

Η αντιβιοτική θεραπεία των λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες (Carbapenem-producing Enterobacteriaceae, CPE) θα έπρεπε να βασίζεται σε δεδομένα από τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, μόνο δύο τέτοιες μελέτες διεξάγονται σε Ευρώπη (AIDA, NCT01732250; <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01732250>) και Η.Π.Α (NCT01597973; <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01597973>). Οι κλινικές αυτές δοκιμές εστιάζουν στην εκτίμηση της θεραπείας με κολιστίνη έναντι στο συνδυασμό κολιστίνης και καρβαπενέμης. Επομένως, η θεραπευτική προσέγγιση των CPE λοιμώξεων στηρίζεται κυρίως στην κλινική εμπειρία. Ο μεγάλος αριθμός των δημοσιευμένων μελετών, με τη μεγάλη ετερογένεια ως προς τον τύπο των λοιμώξεων, τα χαρακτηριστικά των ασθενών και την χρησιμοποίηση των θεραπευτικών σχημάτων, δημιουργεί δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τους λόγους αυτούς, απαιτείται κριτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων των διαφόρων ερευνών και τίθεται η ανάγκη μίας μετα-ανάλυσης.

Το πρόβλημα της θεραπείας των CPE λοιμώξεων θα μπορούσε ίσως να λυθεί με την εισαγωγή στην κλινική πράξη νέων φαρμάκων. Κάποιες νέες ουσίες με πιθανή δράση έναντι των CPE έχουν αναπτυχθεί από τη φαρμακοβιομηχανία 24020742 [163, 320, 321]. Λίγα από αυτά τα νέα φάρμακα αναμένεται να διατεθούν στο εγγύς μέλλον. Πρόκειται για την πλαζομυκίνη [322] και τους δυνητικούς αναστολείς των καρβαπενεμασών κλάσης A (MK-7655 και RPX7009) [320, 323, 324]. Επομένως, θα πρέπει να βασιζόμαστε προς το παρόν στα ήδη διαθέσιμα φάρμακα.

Οι Τζουβελέκης και συν. πραγματοποίησαν μία συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την θεραπευτική προσέγγιση και τα αποτελέσματά της [318].

Ανασύρθηκαν είκοσι μελέτες με στοιχεία που παρείχαν επαρκή δεδομένα. Οι περισσότερες από αυτές αφορούσαν λοιμώξεις από *K.pneumoniae* που παρήγαγαν KPC ή VIM καρβαπενεμάσες, καθώς η κλινική εμπειρία για άλλα CPE παραμένει περιορισμένη. Κύριο δεδομένο των μελετών αυτών ήταν σύγκριση μεταξύ μονοθεραπείας και διπλού θεραπευτικού σχήματος. Συγκεκριμένα, η μονοθεραπεία με ένα δραστικό *in vitro* παράγοντα (πχ. καρβαπενέμη, τγκεκυκλίνη ή κολιστίνη) κατέληγε σε ψηλά ποσοστά θνησιμότητας, στο επίπεδο της θνησιμότητας που αντιστοιχούσε στους ασθενείς που έλαβαν ακατάλληλη αντιβιοτική αγωγή (δεν υπήρχε κανένα δραστικό φάρμακο *in vitro*). Η αναποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας ήταν περισσότερο εμφανής σε ασθενείς με σήψη ή σηπτικό shock και σε ασθενείς με θανατηφόρο υποκείμενο νόσημα.

Αντίθετα, η συνδυασμένη θεραπεία είχε καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε σχέση με τη μονοθεραπεία. Επιπλέον, όταν το διπλό θεραπευτικό σχήμα περιελάμβανε μία καρβαπενέμη, τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τη θνησιμότητα όταν δεν υπήρχε καρβαπενέμη στο συνδυασμό (18.8% και 30.7% αντίστοιχα). Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθούν υπ'όψιν πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες, όπως η ηλικία, η συνοσηρότητα, η βαρύτητα της σήψης και ο χρόνος έναρξης της θεραπείας. Δύο μεγάλες σειρές ασθενών που προσάρμοσαν πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες κατέληξαν επίσης στη σημασία του διπλού θεραπευτικού σχήματος και των καρβαπενεμών για την επιβίωση. Η υπεροχή της συνδυασμένης θεραπείας οφείλεται μερικώς στην αθροιστική ή συνεργική δράση των καρβαπενεμών με την κολιστίνη, την τγκεκυκλίνη και τις αμινογλυκοσίδες.

Η κολιστίνη παραμένει ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φάρμακα για τις CPE λοιμώξεις, παρά την αυξανόμενη τάση αντοχής. Ωστόσο, ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής και το φαινόμενο της παροδικής αντοχής εκ προσαρμογής θα πρέπει

να λαμβάνονται υπ' όψιν στον καθορισμό του δοσολογικού σχήματος και να δίνονται υψηλότερες δόσεις σε αραιότερα διαστήματα [325-327]. Επίσης, οι ανεπιθύμητες ενέργειες της νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας μπορεί να δημιουργήσουν δυσκολίες. Η χρήση της τυγκεκυκλίνης ως μονοθεραπεία παρουσιάζει φτωχά αποτελέσματα. Το φάρμακο αυτό έχει κυρίως βακτηριοστατική δράση και η συγκέντρωση σε αρκετές ανατομικές θέσεις είναι σε υποθεραπευτικά επίπεδα [328-330]. Επιπρόσθετα, υψηλές δόσεις ενέχουν κίνδυνο τοξικότητας. Η φωσφομυκίνη είναι μία ακόμα θεραπευτική επιλογή. Έχει θέση κυρίως σε λοιμώξεις του κατώτερου ουροποιητικού, αλλά και συνδυαστικά σε βαριές CPE λοιμώξεις [331, 332]. Τέλος, ένας σημαντικός αριθμός CPE στελεχών παραμένουν ευαίσθητα *in vitro* στις αμινογλυκοσίδες (γενταμυκίνη και λιγότερο αμικασίνη) [333, 334]. Για το λόγο αυτό, οφείλουμε να τις συμπεριλάβουμε στα θεραπευτικά σχήματα, ακόμα και ως μονοθεραπεία για ουρολοιμώξεις.

9 Μέτρα ελέγχου για τον περιορισμό των CPE

Τα μέτρα ελέγχου για τον περιορισμό των CPE σε ένα νοσοκομειακό περιβάλλον στοχεύουν στον περιορισμό της δεξαμενής τους και τη μείωση της διασποράς τους.

9.1 Η υγιεινή των χεριών

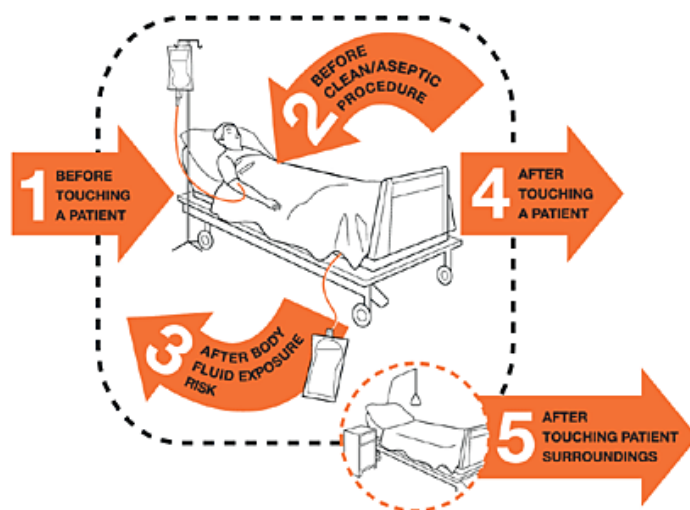
Η μετάδοση των μικροβίων μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας συνοψίζεται στα ακόλουθα βήματα: α) παρουσία των παθογόνων στις χλωρίδες του ασθενούς ή/και στο περιβάλλον του, β) μεταφορά των μικροβίων στα χέρια του

ιατρονοσηλευτικού προσωπικού κατά τη διάρκεια ιατρικών πράξεων ή νοσηλευτικής φροντίδας, γ) επιβίωση των μικροβίων στα χέρια του προσωπικού, δ) λανθασμένη υγιεινή των χεριών και ε) διασπορά σε άλλους νοσηλευόμενους ασθενείς [14].

Οι νοσηλευόμενοι ασθενείς αποικίζονται πού εύκολα και γρήγορα από Gram αρνητικά βακτήρια, ιδιαίτερα στην περιοχή του περινέου [335-338]. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει τη μεταφορά των βακτηρίων αυτών στα χέρια του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού σε ποσοστά που αγγίζουν το 100% [13, 339, 340]. Η παραμονή των βακτηρίων στα χέρια του προσωπικού μπορεί να διαρκέσει από λίγα λεπτά έως μερικές ώρες. Η μεταφορά τους σε άλλους ασθενείς είναι δύσκολο να καταγραφεί. Μελέτες σε ασθενείς σε ΜΕΘ έδειξαν μεταφορά σε ποσοστά από 23% έως 53% των επαφών με ασθενείς [341, 342]. Πέραν των χεριών, τα ρούχα, τα γάντια και οι ποδιές τους προσωπικού μπορούν να μολυνθούν με νοσοκομειακά στελέχη και να αποτελέσουν όχημα μεταφοράς τους μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών [343-345].

Η συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών είναι αρκετά χαμηλή και κυρίως σε χειρουργικές κλινικές. Με βάση μελέτη σε δέκα νοσοκομεία στην Ευρώπη και το Ισραήλ, η συμμόρφωση κυμαίνεται στα επίπεδα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, γύρω στο 40% [346]. Τα αίτια της χαμηλής συμμόρφωσης περιλαμβάνουν το φόρτο εργασίας, τον ερεθισμό του δέρματος από τα αντισηπτικά διαλύματα, την θεωρούμενη επάρκεια των γαντιών, την ακατάλληλη θέση των νιπτήρων και την έλλειψη παραδείγματος από τους ανωτέρους. Η εφαρμογή της σωστής υγιεινής των χεριών οδηγεί σε μείωση της μετάδοσης των CPE, όπως έχουν δείξει διάφορες έρευνες. Οι επαγγελματίες υγείας πρέπει να ενθαρρύνονται στην χρήση αλκοολούχων διαλυμάτων πριν και μετά την επαφή με τον κάθε ασθενή και στο πλύσιμο νερού και σαπουνιού όταν τα χέρια είναι εμφανώς λερωμένα (πχ. με εκκρίσεις ή σωματικά

υγρά). Η συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών μπορεί να καταγράφεται. Ένας τρόπος καταγραφής είναι ο προτεινόμενος από τον ΠΟΥ που βασίζεται στη συμμόρφωση με τα «πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών».



Εικόνα 23 – Τα πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών (ΠΟΥ)

9.2 Τα μέτρα επαφής

Βασικά μέτρα επαφής είναι απαραίτητο να τηρούνται κατά την ιατρική φροντίδα όλων των ασθενών. Ιδιαίτερα μέτρα πρέπει να λαμβάνονται για γνωστούς αποικισμένους ή με λοίμωξη με CPE ασθενείς, προκειμένου να αποφευχθεί η ενδονοσοκομειακή διασπορά [347]. Τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν την υγιεινή των χεριών και τη χρήση προσωπικού προστατευτικού εξοπλισμού. Η χρήση γαντιών και μπλούζας μιας χρήσης είναι υποχρεωτικά μέτρα των προφυλάξεων επαφής. Τα γυαλιά και η απλή χειρουργική μάσκα πρέπει να χρησιμοποιούνται όταν υπάρχει κίνδυνος εκτίναξης βιολογικών υγρών. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιούνται αποκλειστικές ιατρικές συσκευές (πιεσόμετρα, στηθοσκόπια) για τους αποικισμένους ασθενείς. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που διευκολύνουν την εφαρμογή των μέτρων

επαφής, όπως η μόνωση των θετικών ασθενών σε ξεχωριστούς θαλάμους και η απασχόληση συγκεκριμένου νοσηλευτικού προσωπικού. Στην περίπτωση που η μόνωση ή συννοσηλεία αποικισμένων ασθενών δεν είναι δυνατή, θα πρέπει να νοσηλεύονται μαζί με ασθενείς χαμηλού κινδύνου για ανάπτυξη λοίμωξης. Η απόσταση μεταξύ των κρεβατιών θα πρέπει να είναι τουλάχιστον ένα μέτρο και να υπάρχει κάποιος φυσικός φραγμός, ώστε να ελαχιστοποιείται η επαφή μεταξύ των ασθενών. Οι συγγενείς των ασθενών θα πρέπει να ενημερώνονται και να εφαρμόζουν τα μέτρα επαφής. Τέλος, οι μετακινήσεις των αποικισμένων ασθενών και των συνοδών τους θα πρέπει να περιορίζονται στο ελάχιστο.

Κατά την εισαγωγή ενός γνωστού αποικισμένου ασθενούς, θα πρέπει να εφαρμόζονται εκ νέου τα μέτρα επαφής. Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για το πότε είναι ασφαλής η διακοπή της εφαρμογής των προφυλάξεων επαφής. Η πλειοψηφία των μελετών υποστηρίζει την εφαρμογή των μέτρων μέχρι την λήψη δύο ή τριών αρνητικών εβδομαδιαίων δειγμάτων [14]. Άλλοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τρία αρνητικά δείγματα για ασθενείς που δεν έχουν λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία για αρκετές εβδομάδες.

9.3 Η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση

Η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση συνίσταται στην έγκαιρη ανίχνευση των αποικισμένων ασθενών κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο ή κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, με στόχο τη μείωση της διασποράς από ασθενή σε ασθενή εφαρμόζοντας τα απαραίτητα μέτρα επαφής. Το μέτρο αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι μόνο με τα δεδομένα των κλινικών δειγμάτων ένας σημαντικός αριθμός αποικισμένων ασθενών δεν θα εντοπιστεί και θα αποτελέσει πηγή διασποράς πολυανθεκτικών μικροβίων [8,

348, 349]. Επαρκή δείγματα για τη μικροβιολογική επιτήρηση θεωρούνται επιχρίσματα από το ορθό, αλλά και ούρα, φαρυγγικά επιχρίσματα και αναπνευστικές εκκρίσεις. Η ευαισθησία των ορθικών επιχρισμάτων στην ανίχνευση πολυανθεκτικών Gram αρνητικών κυμαίνεται από 42% έως 69% [350, 351]. Ωστόσο, μία μελέτη καταγράφει ποσοστό ευαισθησίας που φτάνει το 78% [352].

Υπάρχουν διάφορα θρεπτικά υλικά για την καλλιέργεια των δειγμάτων επιτήρησης, ανάλογα με το είδος του υπό αναζήτηση μικροοργανισμού και το αναμενόμενο φαινότυπο αντοχής. Όσον αφορά τα CPE, συνήθως τα δείγματα καλλιεργούνται σε MacConkey άγαρ εμπλουτισμένο με καρβαπενέμη. Η επώαση γίνεται για 48 ώρες στους 37°C. Η απομόνωση μικροβίων θα πρέπει να ακολουθείται από την φαινοτυπική ή μοριακή επιβεβαίωση της παρουσίας καρβαπενεμασών. Η εφαρμογή μεθόδων αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης απ' ευθείας σε δείγματα αποικισμού βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, οπότε η συμβατική καλλιέργεια παραμένει η μέθοδος εκλογής. Η συχνότητα της μικροβιολογικής επιτήρησης αποτελεί ένα σημαντικό σημείο. Γενικά, θεωρείται ότι θα πρέπει να συνεχίζεται σε εβδομαδιαία βάση μέχρι να μην ανιχνεύονται νέες περιπτώσεις αποικισμού ή λοίμωξης, υποδηλώνοντας ότι η διασπορά έχει σταματήσει [353].

9.4 Η μόνωση ή συννοσηλεία των αποικισμένων ασθενών

Η μικροβιολογική επιτήρηση δεν αποτελεί από μόνη της μέτρο ελέγχου των CPE. Θα πρέπει να συνοδεύεται και να ακολουθείται από την εφαρμογή άλλων στρατηγικών περιορισμού της διάδοσης των πολυανθεκτικών παθογόνων. Σημαντικό μέτρο που πρέπει να ακολουθεί την ανάδειξη αποικισμένου ή με λοίμωξη ασθενούς είναι η μεταφορά του σε μόνωση ή σε χώρο που είναι ειδικά διαμορφωμένος, όπου

αυτό είναι εφικτό. Στην περίπτωση που η μόνωση δεν είναι εφαρμόσιμη, συστήνεται η συννοσηλεία (cohorting) ασθενών με αποικισμό ή λοίμωξη από πολυανθεκτικά στελέχη. Το μέτρο αυτό από μόνο του μειώνει τη διασπορά των πολυανθεκτικών βακτηρίων, αλλά διευκολύνει και τη εφαρμογή άλλων προφυλάξεων, όπως η υγιεινή των χεριών και τα μέτρα επαφής. Η εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου σε δεδομένα από χειρουργική κλινική της χώρας μας κατέληξε στο ότι μέτρια συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών σε συνδυασμό με μικροβιολογική επιτήρηση και απομόνωση των θετικών ασθενών μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορο περιορισμό της μετάδοσης των CP-Kp [19].

Η νοσηλεία σε μόνωση θα πρέπει να γίνεται κατά προτεραιότητα σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο μεταδοτικότητας. Τέτοιες περιπτώσεις είναι ασθενείς με εκτεταμένη λοίμωξη μαλακών μορίων, τραύματα, εγκαύματα, διαβητικό πόδι, κατακλίσεις και δερματοπάθειες, όπως πέμφιγα και έκζεμα. Στην περίπτωση, που η μικροβιολογική επιτήρηση συνοδεύεται από μόνωση ή συννοσηλεία των φορέων που αναδεικνύονται ή και από άλλα μέτρα, χαρακτηρίζεται ως ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση.

9.5 Αποκλειστικό νοσηλευτικό προσωπικό

Ένα από τα μέτρα μείωσης της διασποράς των νοσοκομειακών παθογόνων είναι ο περιορισμός όσο το δυνατό περισσότερο του αριθμού του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού που εμπλέκεται στην φροντίδα του. Στην ιδανικότερη περίπτωση, η ύπαρξη ενός μόνο νοσηλευτή για τους αποικισμένους ασθενείς μειώνει τον κίνδυνο που υπάρχει να μεταφερθούν τα πολυανθεκτικά παθογόνα από το ένα ασθενή στον άλλο κατά τη διάρκεια της νοσηλείας. Επιπλέον, περιορίζεται η χρήση

συγκεκριμένων συσκευών (πιεσόμετρα, στηθοσκόπια) σε ένα ή λίγα άτομα. Ωστόσο, πρόκειται για ένα αρκετά δύσκολο στην εφαρμογή του μέτρο, κυρίως λόγω της αναλογίας του νοσηλευτικού προσωπικού προς τους ασθενείς. Για παράδειγμα, στα ελληνικά νοσοκομεία, υπάρχει ένας συνήθως νοσηλευτής για όλη την κλινική κατά τη νυχτερινή βάρδια νοσηλείας.

9.6 Η απολύμανση του περιβάλλοντος

Η καθαριότητα των διαφόρων επιφανειών σε νοσηλευτικά ιδρύματα έχει αποδειχτεί πολύ σημαντικό μέτρο στον έλεγχο των λοιμώξεων από Gram θετικά μικρόβια [354]. Όσον αφορά τα Gram αρνητικά, οι περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν τη σημασία του μέτρου κυρίως για το *Acinetobacter spp.*, όμως προτείνεται πάντα στα πλαίσια των προγραμμάτων περιορισμού των πολυανθεκτικών παθογόνων [354, 355]. Σε αντίθεση με το *Acinetobacter spp.*, τα Εντεροβακτηριακά δεν φαίνεται να επιβιώνουν για πολύ σε ξηρό περιβάλλον (πχ. σκόνη). Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι τα Gram αρνητικά έχουν μεγαλύτερες δυνατότητες επιβίωσης σε σχέση με τα Gram θετικά [356]. Επιπλέον είδη *Escherichia coli* και *Klebsiella spp.* μπορούν να επιβιώσουν για πάνω από ένα έτος υπό ειδικές συνθήκες. Τα Gram αρνητικά απομονώνονται από δάπεδα, ράφια, κουρτίνες, πετσέτες, παπλώματα, κρεβάτια, έπιπλα, υπολογιστές, τηλεφωνικές συσκευές, κάδους απορριμμάτων και σφουγγαρίστρες, καθώς και από όλα τα αντικείμενα ιατρικού εξοπλισμού [357-359].

Για τον καθαρισμό ιατρικών εργαλείων που έρχονται σε επαφή με το δέρμα και όχι με βλεννογόνους (πιεσόμετρα, στηθοσκόπια, θερμόμετρα), απαιτείται απολύμανση χαμηλού επιπέδου με αλκοολούχα διαλύματα. Για τον καθαρισμό των δαπέδων θα πρέπει να προηγείται καθαρισμός με νερό και απορρυπαντικό και στη

συνέχεια χρήση διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου ή διχλωροϊσοκυανουριδίου του νατρίου. Αντίστοιχος είναι ο καθαρισμός που προτείνεται για έπιπλα, κρεβάτια, πόρτες, πόμολα, τοίχους και οριζόντιες επιφάνειες. Η χρήση της χλωρίνης είναι δραστική σε επιφάνειες στις οποίες έχει αναπτυχθεί βιομεμβράνη (biofilm). Για τον καθαρισμό των δωματίων απομόνωσης, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γάντια, φόρμα και μάσκες μίας χρήσης. Τα δωμάτια μόνωσης θα πρέπει να έχουν το μικρότερο αριθμό επίπλων και αντικειμένων. Όλα τα αντικείμενα (χαρτί, σαπούνι) θα πρέπει να θεωρούνται μολυσμένα και να απορρίπτονται και όλα τα είδη ιματισμού θα πρέπει να απομακρύνονται ως μολυσμένα και να απολυμαίνονται [14].

9.7 Η κατανάλωση των αντιβιοτικών

Η προγενέστερη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών αναδεικνύεται ως παράγοντας κινδύνου για τον αποικισμό και τις λοιμώξεις από πολυανθεκτικά παθογόνα [360]. Παρ' όλα αυτά, η άμεση συσχέτιση μεταξύ αντιβιοτικής θεραπείας και απόκτησης ανθεκτικών βακτηρίων είναι ασαφής. Υπάρχουν ποικίλες προσεγγίσεις για τον έλεγχο και τον περιορισμό της κατανάλωσης αντιβιοτικών σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Ο περιορισμός της χρήσης και η ανάγκη έγκρισης από ειδικό λοιμωξιολόγο αποτελεί μία από τις κυριότερες προσεγγίσεις. Μία εναλλακτική πρακτική είναι η εναλλαγή διαφόρων κατηγοριών αντιβιοτικών ως στρατηγική για τη μείωση της αντιμικροβιακής αντοχής. Τέλος, η εφαρμογή κατευθυντήριων οδηγιών και πρωτοκόλλων στη χρήση των αντιβιοτικών είναι ένας τρόπος ορθολογιστικής χρήσης [14].

Η εφαρμογή προγράμματος περιορισμού της κατανάλωσης των αντιβιοτικών σε επιδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα οδήγησε σε βελτίωση της ευαισθησίας για τα β-

λακταμικά και τις κινολόνες. Σε ενδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα, παρατηρήθηκε παροδική συσχέτιση μεταξύ χρήσης αντιβιοτικών και αντιμικροβιακής αντοχής [361]. Τόσο σε επιδημικά όσο και σε ενδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα, η παρέμβαση του περιορισμού των αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της εξάπλωσης Εντεροβακτηριακών που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs). Αντίθετα, η σύσταση για περιορισμό της κατανάλωσης αντιβιοτικών με στόχο τον έλεγχο πολυανθεκτικών στελεχών *K.pneumoniae* είναι μέτριας σημασίας και προτείνεται υπό όρους σε ενδημικές και επιδημικές συνθήκες [14].

9.8 Μείωση της φορείας με χρήση αντισηπτικών

Η χρησιμοποίηση θεραπευτικών σχημάτων για την αντιμετώπιση του αποικισμού έχει μελετηθεί ευρέως για τον MRSA, ενώ λίγα δεδομένα υπάρχουν για την σημασία τους στα ESBL Εντεροβακτηριακά [362-365]. Η μελέτη των Saidel-Odes et al. για την χρήση της γενταμυκίνης και της πολυμυξίνης E για την εκρίζωση της φορείας των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K.pneumoniae* έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση στις δύο εβδομάδες, αλλά η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική στις έξι εβδομάδες [366]. Το καθημερινό μπάνιο με χλωροεξιδίνη έχει εφαρμοστεί για τη μείωση του φορτίου του VRE και του MRSA σε ασθενείς, ιατρονοσηλευτικό προσωπικό και άψυχο περιβάλλον [367]. Δύο πρόσφατες έρευνες κατέληξαν σε αντιφατικά αποτελέσματα ως προς την αξία του μπάνιου με χλωροεξιδίνη σε ασθενείς νοσηλευόμενους σε ΜΕΘ [368, 369]. Τέλος, έχει αναφερθεί μειωμένη ευαισθησία Gram αρνητικών βακτηρίων στην χλωροεξιδίνη

[370]. Η έλλειψη σαφών στοιχείων για τη σημασία του μέτρου στην εξάπλωση των CP-Kp το καθιστά προαιρετικό και πάντα ως μέρος μίας ευρύτερης δέσμης μέτρων.

9.9 Ο ρόλος της εκπαίδευσης

Η σημασία της επιμόρφωσης και εκπαίδευσης του προσωπικού των χώρων παροχής υπηρεσιών υγείας είναι καίριας σημασίας. Οι αρμόδιοι κρατικοί φορείς πρέπει να μεθοδεύουν εκπαιδευτικά προγράμματα σε όλες τις βαθμίδες των υπηρεσιών υγείας. Συγκεκριμένα, το προσωπικό θα πρέπει να ενημερώνεται για την αξία των προγραμμάτων ελέγχου της διασποράς των πολυανθεκτικών παθογόνων και να εκπαιδεύεται στις αντίστοιχες πρακτικές (υγιεινή των χεριών, μέτρα επαφής και διαχείριση αποικισμένων ή με λοίμωξη ασθενών). Τα εκπαιδευτικά προγράμματα θα πρέπει να γίνονται από εξειδικευμένο προσωπικό (λοιμωξιολόγους και επιτροπές ελέγχου λοιμώξεων) και να απευθύνονται σε όλους τους επαγγελματίες υγείας (ιατρούς, νοσηλευτές, φυσιοθεραπευτές, προσωπικό θαλάμων, συνεργεία καθαρισμού και φοιτητές) [14].

9.10 Επίβλεψη της εφαρμογής των μέτρων

Σημαντικό μέρος ενός προγράμματος ελέγχου της διασποράς των πολυανθεκτικών νοσοκομειακών παθογόνων και των αντίστοιχων λοιμώξεων αποτελεί η επιτήρηση για την εφαρμογή των προτεινόμενων μέτρων. Η υπεύθυνη για την επιτήρηση ομάδα θα πρέπει να συγκροτείται από καταρτισμένου και εκπαιδευμένο προσωπικό (λοιμωξιολόγοι, μικροβιολόγοι, νοσηλευτές, επιτροπές ελέγχου λοιμώξεων). Η επίβλεψη της εφαρμογής των μέτρων μπορεί να γίνει με

διάφορα μέσα. Η συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών μπορεί να γίνει με την καταγραφή από ειδικό παρατηρητή της εφαρμογής της υγιεινής σε διάφορα στάδια επαφής με τον ασθενή. Για το σκοπό αυτό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το προτεινόμενο έντυπο από τον ΠΟΥ (Observation Form, Annex 34 of the Guide to Implementation, WHO 2007). Η μεθοδολογία βασίζεται στη συμμόρφωση των επαγγελματιών υγείας με τα «πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών». Ο έλεγχος της συμμόρφωσης με τα μέτρα επαφής είναι αρκετά δυσχερές. Είναι, όμως, δυνατή η επιτήρηση της μικροβιολογικής επιτήρησης των ασθενών και η επίβλεψη της διαχείρισης των αποικισμένων νοσηλευόμενων. Τέλος, η ομάδα επιτήρησης θα πρέπει να αξιολογεί τη συμμόρφωση και τα αποτελέσματα των πρακτικών ελέγχου και να προτείνει τροποποιήσεις σε περίπτωση αποτυχίας.

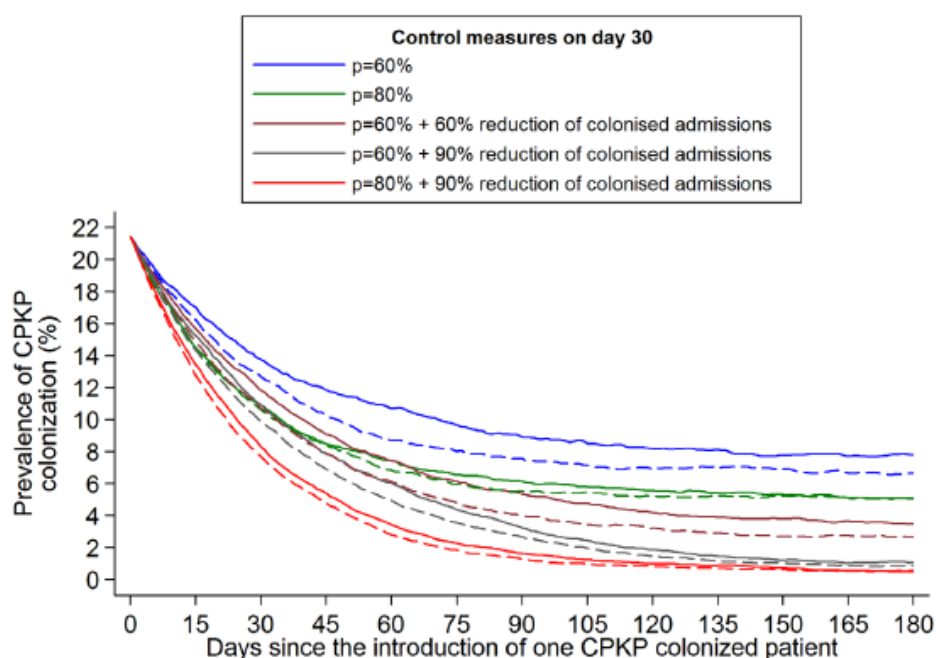


Figure 6. Impact of infection control measures on the prevalence of CPKP colonization in an hyperendemic setting. Infection control measures start on day 0 where a high colonization prevalence of 21% was assumed. The evaluated scenarios include: **1.** Hand hygiene compliance $p = 60\%$, **2.** $p = 80\%$, **3.** $p = 60\%$ and reduce colonization prevalence on admission of CPKP by 60% (through active surveillance and subsequent isolation or strict contact precautions for positive patients), **4.** $p = 60\%$ and reduce colonization prevalence on admission of CPKP by 90%, **5.** $p = 80\%$ and reduce colonization prevalence on admission of CPKP by 90%. Dashed lines (- -) correspond to the above scenarios with the addition of 50% reduction in the duration of antibiotic usage during patients' stay in the unit (assuming a relative risk associated with antibiotic use equal to 3). doi:10.1371/journal.pone.0041068.g006

Εικόνα 24 – Εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου για τη σημασία των μέτρων ελέγχου διάδοσης των CP-Kp [19]

Ειδικό μέρος

1 Σκοπός της μελέτης

Τα στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CP-Kp) έχουν εγκατασταθεί ως ένα σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο σε διεθνές επίπεδο [12, 371]. Τα ποσοστά του αποικισμού και των λοιμώξεων από CP-Kp στελέχη στα τεταρτοβάθμια νοσοκομεία της χώρας μας βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών [372]. Οι καταστροφικές συνέπειες για τους ασθενείς, σε συνδυασμό με την άποψη ότι η διασπορά των στελεχών αυτών στην Βόρεια Ευρώπη οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην μετάδοσή τους από την Ελλάδα, έχουν οδηγήσει σε προσπάθειες να περιοριστεί το πρόβλημα [373]. Ωστόσο, τα μέχρι στιγμής δεδομένα αυτών των προσπαθειών είναι οριακά και βραχύβια [374]. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στις περιορισμένες δυνατότητες σε ανθρώπινο δυναμικό και οικονομικούς πόρους σε πολλά νοσοκομεία, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η πλήρης και κατάλληλη εφαρμογή των απαραίτητων μέτρων σε σταθερή και βιώσιμη βάση [375].

Η εφαρμογή ενός μαθηματικού μοντέλου στα δεδομένα μίας προηγούμενης μελέτης παρατήρησης που πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών (Γ.Ν.Α. Λαϊκό), όπου η διατήρηση της ενδημικότητας των CP-Kp οφειλόταν στην εισαγωγή φορέων και την ενδονοσοκομειακή μετάδοση, ανέδειξε τον καίριο ρόλο της ενεργούς μικροβιολογικής επιτήρησης στον έλεγχο της διασποράς των CP-Kp στελεχών [19]. Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα και έχοντας υπ'όψιν τους περιορισμένους πόρους του νοσοκομείου μας, προσπαθήσαμε να περιορίσουμε τη διασπορά των CP-Kp με την εφαρμογή μίας δέσμης εφικτών μέτρων στην Αιματολογική Κλινική, όπου η επίπτωση των λοιμώξεων και η θνησιμότητα από τέτοια παθογόνα ήταν υψηλές.

Ειδικότερα, οι επιμέρους στόχοι της μελέτης είναι οι εξής:

✓ **Πρωτεύων στόχος**

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μίας προτεινόμενης δέσμης μέτρων για τον περιορισμό της μετάδοσης CP-Kp μικροοργανισμών μεταξύ νοσηλεύομενων ασθενών με αιματολογικά νοσήματα.

✓ **Δευτερεύοντες στόχοι**

1. Η μελέτη της σημασίας του αποικισμού/λοίμωξης στην νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών.
2. Η επιδημιολογία των CP-Kp και των καρβαπενεμασών στην Κλινική.
3. Η διάρκεια του αποικισμού με CP-Kp στελέχη σε πάσχοντες από αιματολογικά νοσήματα.

2 Υλικό και Μέθοδοι

2.1 Σχεδιασμός της μελέτης

Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη παρέμβασης και παρατήρησης που διεξήχθη στην Αιματολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών που εδράζεται στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», κατόπιν έγκρισης διεξαγωγής από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου. Πρόκειται για μία Κλινική με 31 κλίνες. Συγκεκριμένα, επτά θάλαμοι είναι τρίκλινοι, τρεις θάλαμοι

έχουν δύο κλίνες και τέσσερις είναι μονόκλινοι. Οι τέσσερις μονόκλινοι θάλαμοι αποτελούν τη Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών (Μ.Μ.Μ.Ο) που ανήκει στην Κλινική. Η αναλογία νοσηλευτών/ασθενών είναι 1:10 κατά το πρωινό ωράριο και 1:15 κατά τη διάρκεια της απογευματινής και βραδινής βάρδιας. Στην Κλινική πραγματοποιούνται κατά μέσο όρο 80-90 εισαγωγές ανά μήνα, οι οποίες αντιστοιχούν σε 800-900 ασθενείς-ημέρες μηνιαίως. Νιπτήρες και συσκευές με αλκοολούχα αντισηπτικά διαλύματα υπήρχαν σε όλους τους θαλάμους.

Στη μελέτη περιελήφθησαν όλοι οι ασθενείς που εισήχθησαν διαδοχικά στην Αιματολογική Κλινική και πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής (Πίνακας 10). Η συμμετοχή των ασθενών έγινε μετά από ενημέρωση και συγκατάθεση των ατόμων, διέπεται από τις αρχές δεοντολογίας της Διακήρυξης του Ελσίνκι και είναι σύμφωνη με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ορθής Επιδημιολογικής Πρακτικής. Οι υπό μελέτη ασθενείς εισήχθησαν στην κλινική είτε μέσω του τμήματος επειγόντων περιστατικών (μετά από επείγουσα ή προγραμματισμένη εισαγωγή), είτε μετεφέρθησαν από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα ή άλλα τμήματα του νοσοκομείου.

Πίνακας 10 - Κριτήρια επιλογής ασθενών.

<p><u>Κριτήρια επιλογής:</u></p> <ul style="list-style-type: none">❖ Εισαγωγή στην Αιματολογική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου❖ Αποδοχή συμμετοχής του ασθενούς <p><u>Κριτήρια αποκλεισμού:</u></p> <ul style="list-style-type: none">❖ Ύπαρξη παθήσεων που εμποδίζουν τη λήψη δείγματος❖ Δειγματοληψία σε χρονικό διάστημα άνω των 48 ωρών από την εισαγωγή❖ Άρνηση συμμετοχής του ασθενούς

Η μελέτη ξεκίνησε τον Ιούνιο του 2011 και ολοκληρώθηκε το Δεκέμβριο του 2014. Το Μάιο του 2011 πραγματοποιήθηκε σημειακός επιπολασμός του αποικισμού με CP-Kp στελέχη μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών της Κλινικής και ενημέρωση του ιατρονοσηλευτικού και βοηθητικού προσωπικού για τη διεξαγωγή και τις λεπτομέρειες της έρευνας. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν εκπαιδευτικά σεμινάρια από την ομάδα της μελέτης για τα μέτρα ελέγχου των πολυανθεκτικών παθογόνων και τη σημασία της εφαρμογής τους. Η εφαρμογή της προτεινόμενης δέσμης μέτρων περιορισμού των CP-Kp άρχισε τον Ιούνιο του 2011 και συνεχίστηκε έως και τον Δεκέμβριο του 2014. Παράλληλα, συλλέχτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο και το Τμήμα Φαρμακείου του νοσοκομείου, που αφορούσαν στις λοιμώξεις που σημειώθηκαν και στην κατανάλωση αντιβιοτικών στην Κλινική για χρονικό διάστημα προγενέστερο της προώθησης των μέτρων ελέγχου της μελέτης μας (Ιανουάριος του 2010 - Μάιος του 2011) και καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η μικροβιολογική επεξεργασία και φύλαξη των μικροβιακών στελεχών της μελέτης έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ.Κ. Δαΐκος» του Πανεπιστημίου Αθηνών.



Εικόνα 25 – Χρονοδιάγραμμα της μελέτης

2.2 Ορισμοί – Διευκρινίσεις

2.2.1 Ορισμός αποικισμένου ασθενούς

Ασθενής που νοσηλεύεται και εμφανίζει αποικισμό από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολάβησει από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο μέχρι την απομόνωση του πολυανθεκτικού στελέχους από τις χλωρίδες του. Για τον ορισμό του αποικισμού απαιτείται η συνύπαρξη και των δύο παρακάτω κριτηρίων:

1. Έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων συμβατών με κλινική λοίμωξη και
2. Μικροβιολογική τεκμηρίωση με απομόνωση του εν λόγω μικροοργανισμού από χλωρίδες των ασθενών.

2.2.2 Ορισμός αποικισμένου ασθενούς κατά την εισαγωγή

Ασθενής που εισάγεται για νοσηλεία και εμφανίζει αποικισμό από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* σε δείγμα φορείας που λαμβάνεται εντός 48 ωρών από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο. Θα πρέπει και πάλι να ισχύουν τα παραπάνω δύο κριτήρια.

2.2.3 Ορισμός αποικισμένου ασθενούς κατά τη νοσηλεία

Ασθενής που εισάγεται για νοσηλεία και εμφανίζει αποικισμό από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* σε δείγμα φορείας, αφού έχουν μεσολάβησει ένα ή περισσότερα αρνητικά δείγματα ελέγχου από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο. Θα πρέπει και πάλι να ισχύουν τα παραπάνω δύο κριτήρια.

2.2.4 Ορισμός μεμονωμένου κρούσματος ασθενούς με λοίμωξη

Ως μεμονωμένο κρούσμα ασθενούς με λοίμωξη ορίζεται κάθε ασθενής που νοσηλεύεται και εμφανίζει κλινική λοίμωξη μικροβιολογικά τεκμηριωμένη από ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολαβήσει από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο μέχρι την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων της λοίμωξης ή την απομόνωση του λοιμογόνου παράγοντα. Για την τεκμηρίωση της λοίμωξης απαιτείται η συνύπαρξη και των δύο παρακάτω κριτηρίων:

1. Κλινική εικόνα συμβατή με λοίμωξη (κλινικά συμπτώματα ή/και σημεία, εργαστηριακά και ακτινολογικά δεδομένα συμβατά με κλινική λοίμωξη) και
2. Μικροβιολογική τεκμηρίωση λοίμωξης: κλινικό βιολογικό δείγμα από φυσιολογικά στείρα περιοχή, από το οποίο θα έχει απομονωθεί *Klebsiella pneumoniae* που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή καρβαπενεμάσης.

Κάθε ασθενής με κλινικά και μικροβιολογικά τεκμηριωμένη λοίμωξη από CP-Kp στέλεχος θεωρείται αποικισμένος, ακόμα και με αρνητικά δείγματα φορείας. Επιπλέον, ως έναρξη της λοίμωξης ορίζεται η ημερομηνία του πρώτου θετικού κλινικού δείγματος.

2.2.5 Ορισμός αρνητικοποίησης αποικισμένου ασθενούς

Θεωρούμε ότι ένας αποικισμένος ασθενής έχει αρνητικοποιήσει τον αποικισμό του από το CP-Kp στέλεχος μετά την καταγραφή τουλάχιστον τριών διαδοχικών αρνητικών δειγμάτων φορείας μετά από ένα θετικό δείγμα αποικισμού.

2.3 Δέσμη μέτρων

Στην Αιματολογική Κλινική που διεξήχθη η παρούσα μελέτη, προτάθηκε και εφαρμόστηκε μία δέσμη μέτρων ελέγχου λοιμώξεων και διασποράς CP-Kp στελεχών. Η επιλογή των μέτρων βασίστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες οργανισμών (όπως το ESCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) και στις οδηγίες του σχεδίου δράσης «Προκρούστης» που εφαρμόστηκε στη χώρα μας από τον Οκτώβριο του 2010 για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά παθογόνα σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας.

Πριν την έναρξη της εφαρμογής των μέτρων τον Ιούνιο του 2011, το υγειονομικό προσωπικό της Κλινικής παρακολούθησε επιμορφωτικό σεμινάριο για τα μέτρα πρόληψης της διασποράς πολυανθεκτικών παθογόνων και τη σημασία της εφαρμογής τους. Ακολούθως, η ερευνητική ομάδα συνέχισε την εκπαίδευση και επίβλεψη του προσωπικού σε αραιότερα διαστήματα, αρχικά μηνιαία και στη συνέχεια ανά τρίμηνο. Επίσης, δόθηκαν γραπτές οδηγίες στους συγγενείς των ασθενών. Αλκοολούχα αντισηπτικά διαλύματα χεριών και νιπτήρες υπήρχαν σε όλους τους θαλάμους. Τέλος, προστατευτικός εξοπλισμός (γάντια και ποδιές μίας χρήσης) ήταν διαθέσιμος στην μονάδα.

Επιγραμματικά, από τον Ιούνιο του 2011 εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα μέτρα:

- i. Ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση για έλεγχο φορείας μέσω ορθικών και φαρυγγικών δειγμάτων,
- ii. Διαχωρισμός φορέων από μη φορείς με απομόνωση ή συννοσηλεία των ασθενών με αποικισμό/λοίμωξη,

- iii. Αποκλειστικός νοσηλευτής για τους φορείς,
- iv. Μέτρα επαφής,
- v. Ενίσχυση της συμμόρφωσης με την υγιεινή των χεριών.
- vi. Καθαρισμός του περιβάλλοντος δύο φορές ημερησίως.
- vii. Επιπλέον, στην κλινική εφαρμόζοταν από το 2010 και πρόγραμμα περιορισμού της χρήσης των αντιβιοτικών, το οποίο και συνεχίστηκε να εφαρμόζεται κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Περίοδος πριν την παρέμβαση Ιανουάριος 2010-Μάιος 2011	<ul style="list-style-type: none"> • Δεδομένα βακτηριαμιών
Πρώτη περίοδος παρέμβασης Ιούνιος 2011-Δεκέμβριος 2012	<ul style="list-style-type: none"> • Ενεργός επιτήρηση στη εισαγωγή και εβδομαδιαίως • Υγιεινή των χεριών • Φυσικός διαχωρισμός φορέων και ασθενών με λοίμωξη • Αποκλειστικός νοσηλευτής • Μέτρα επαφής • Απολύμανση περιβάλλοντος • Δεδομένα βακτηριαμιών
Δεύτερη περίοδος παρέμβασης Ιανουάριος 2013-Ιούνιος 2013	<ul style="list-style-type: none"> • Ενεργός επιτήρηση στη εισαγωγή • Υγιεινή των χεριών • Φυσικός διαχωρισμός φορέων και ασθενών με λοίμωξη • Αποκλειστικός νοσηλευτής • Μέτρα επαφής • Απολύμανση περιβάλλοντος • Δεδομένα βακτηριαμιών
Τρίτη περίοδος παρέμβασης Ιούλιος 2013-Δεκέμβριος 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Υγιεινή των χεριών • Διαχωρισμός γνωστών φορέων και ασθενών με λοίμωξη • Αποκλειστικός νοσηλευτής • Μέτρα επαφής • Απολύμανση περιβάλλοντος • Δεδομένα βακτηριαμιών

Εικόνα 26 – Μέτρα παρέμβασης βάσει χρονικής περιόδου μελέτης

2.3.1 Ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση

Ο σκοπός του συγκεκριμένου μέτρου ήταν ο έγκαιρος εντοπισμός αποικισμένων ασθενών με CP-Κρ στελέχη κατά την εισαγωγή τους στην Κλινική και κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους, έτσι ώστε να εφαρμοστούν ακολούθως οι προφυλάξεις επαφής, ο διαχωρισμός των φορέων και η τήρηση αποκλειστικού νοσηλευτή.

Οι ασθενείς, που νοσηλεύτηκαν από τον Ιούνιο του 2011 έως και τον Ιούνιο του 2013, εξετάστηκαν για έλεγχο φορέας CP-Κρ. Κατάλληλα για τον έλεγχο φορέας δείγματα θεωρήθηκαν, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, επιχρίσματα από το ορθό και το φάρυγγα, τα οποία διαχειριστήκαμε για κάθε ασθενή σαν ένα δείγμα. Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν δύο αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί σε αποστειρωμένα γυάλινα σωληνάκια, οι οποίοι διωγραινόνταν με 2-3 σταγόνες 0.9% NaCl ή αποστειρωμένο νερό και περιστρέφονταν 5-10 φορές εντός του ορθού και του φάρυγγα. Τα δείγματα φορέας λαμβάνονταν εντός 48 ωρών από την εισαγωγή των ασθενών και ο έλεγχος επαναλαμβανόταν σε εβδομαδιαία βάση έως την έξοδο από το νοσοκομείο, από τον Ιούνιο του 2011 έως και το Δεκέμβριο του 2012. Από τον Ιανουάριο του 2013 έως και τον Ιούνιο του 2013, ο έλεγχος περιορίστηκε σε ένα δείγμα εντός 48ώρου από την εισαγωγή. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρονταν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαΐκος» σε διάστημα 30 λεπτών για την περαιτέρω μικροβιολογική επεξεργασία. Μετά την ανάδειξη ενός αποικισμένου ασθενούς γινόταν απευθείας ενημέρωση του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού της Κλινικής. Οι θεράποντες ιατροί αναλάμβαναν την ενημέρωση του ασθενούς και των οικείων προσώπων που εμπλέκονταν στην φροντίδα του (συγγενείς, αποκλειστικές νοσηλεύτριες).

2.3.2 Διαχωρισμός φορέων από μη φορείς

Μετά την ενημέρωση της Κλινικής για την ανίχνευση ενός αποικισμένου νοσηλευόμενου ασθενούς, είχε δοθεί η οδηγία για διαχωρισμό του από τους υπόλοιπους ασθενείς. Ο διαχωρισμός γινόταν με μόνωση του φορέα σε ιδιαίτερο θάλαμο (isolation). Όταν δεν υπήρχε η δυνατότητα απομόνωσης σε ξεχωριστό θάλαμο, οι ασθενείς με αποικισμό ή λοίμωξη από CP-Kp παρέμεναν απομονωμένοι στον ίδιο θάλαμο νοσηλείας (συννοσηλεία, cohorting). Στην περίπτωση που δεν υπήρχε ούτε η δυνατότητα συν-νοσηλείας, οι φορείς θα έπρεπε να νοσηλεύονται μαζί με ασθενείς χαμηλού κινδύνου για την ανάπτυξη σοβαρής λοίμωξης. Το μέτρο του διαχωρισμού για τους αποικισμένους ασθενείς ίσχυε για κάθε επόμενη εισαγωγή και νοσηλείας τους στην Κλινική. Στην περίπτωση καταγραφής τριών τουλάχιστον διαδοχικών αρνητικών δειγμάτων φορείας και απουσίας αντίστοιχων λοιμώξεων, θεωρούσαμε ότι ο ασθενής είχε αρνητικοποιήσει τον αποικισμό του και γινόταν άρση του μέτρου του διαχωρισμού.

2.3.3 Αποκλειστικός νοσηλευτής για τους φορείς

Η πρακτική αυτή στοχεύει στην εμπλοκή όσο το δυνατόν μικρότερου αριθμού επαγγελματιών υγείας στη φροντίδα των αποικισμένων ασθενών. Συγκεκριμένα, προτάθηκε ο καθορισμός συγκεκριμένων ατόμων από το νοσηλευτικό προσωπικό που θα αναλάμβαναν αποκλειστικά τη νοσηλεία των αποικισμένων ασθενών. Στην περίπτωση που δεν υπήρχε αυτή η δυνατότητα, προτάθηκε ο περιορισμός του αριθμού των ατόμων που ασχολούνται με τη φροντίδα αυτών των ασθενών στο ελάχιστο δυνατό. Απώτερος σκοπός του μέτρου ήταν η μείωση των ατόμων που θα είχαν επαφές με τους CP-Kp φορείς και ο περιορισμός της επαφής των νοσηλευτών

αυτών με τους μη-φορείς, αφού η μεταφορά των στελεχών αυτών μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας αποτελεί την κυριότερη οδό διασποράς στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

2.3.4 Μέτρα επαφής

Μετά την ενημέρωση της Κλινικής για έναν αποικισμένο νοσηλευόμενο ασθενή, πέραν της μόνωσης ή συν-νοσηλείας με άλλους αποικισμένους ασθενείς, το προσωπικό όφειλε να εφαρμόζει τις απαραίτητες προφυλάξεις επαφής. Οι πρακτικές προφύλαξης στοχεύουν στον περιορισμό της πιθανότητας μόλυνσης των επαγγελματιών υγείας κατά την επαφή τους με τους αποικισμένους ασθενείς. Τα μέτρα επαφής έπρεπε να εφαρμόζονται μέχρι την έξοδο των αποικισμένων ασθενών από το νοσοκομείο και να γίνεται παρόμοια διαχείριση σε κάθε επόμενη νοσηλεία, εκτός και αν υπήρχε τεκμηριωμένη αρνητικοποίηση της φορείας από το CP-Κρ στέλεχος.

Τα μέτρα επαφής που προτάθηκαν περιελάμβαναν τη χρησιμοποίηση γαντιών, ποδιάς και μάσκας μίας χρήσης σε κάθε επαφή με τον αποικισμένο ασθενή, τα οποία στη συνέχεια θα απορρίπτονταν σε ειδικό κάδο και δεν θα χρησιμοποιούνταν σε επόμενη επαφή με άλλο αποικισμένο ή μη ασθενή. Επίσης, προτάθηκε η χρησιμοποίηση ιδιαίτερου ιατρικού και νοσηλευτικού εξοπλισμού (πχ πιεσόμετρα, στηθοσκόπια) για τους αποικισμένους ασθενείς. Στην περίπτωση που αυτό δεν ήταν εφαρμόσιμο, θα έπρεπε να απολυμαίνεται κάθε ιατρική συσκευή πριν και μετά από τη χρησιμοποίησή της με κατάλληλο αντισηπτικό διάλυμα. Παράλληλα, έπρεπε να υπάρχει ειδική σήμανση ότι πρόκειται για φορέα πολυανθεκτικού μικροβίου (πράσινη βούλα) στο κρεβάτι και το φάκελο του ασθενούς. Οι μετακινήσεις των αποικισμένων ασθενών θα έπρεπε να περιορίζονται στις απολύτως απαραίτητες. Επιβεβλημένη ήταν

η ενημέρωση του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού μεταφοράς και υποδοχής των ασθενών στο νέο τμήμα. Το προσωπικό της Κλινικής όφειλε να ενημερώσει τον ασθενή και τους οικείους του για την εφαρμογή των μέτρων υγιεινής και προφύλαξης και να επιβάλλει τον περιορισμό των επισκεπτών. Μετά την έξοδο των ασθενών από το νοσοκομείο, έπρεπε να γίνεται σχολαστική απολύμανση του θαλάμου νοσηλείας, όλων των επιφανειών (κρεβάτια, ντουλάπες, μπάνιο κλ), όπως και των ιατρικών συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν.

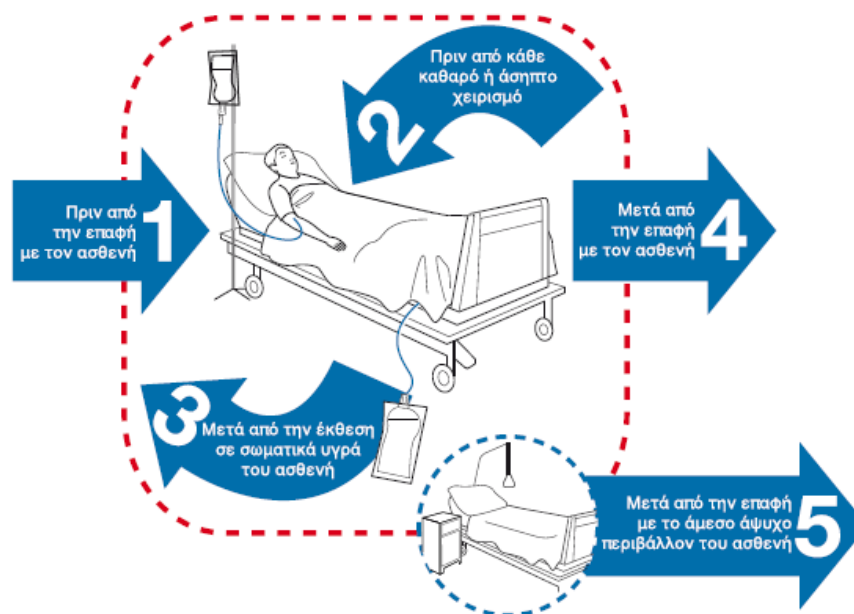
2.3.5 Ενίσχυση της συμμόρφωσης με την υγιεινή των χεριών

Η ενίσχυση της συμμόρφωσης του προσωπικού της Κλινικής με την εφαρμογή της υγιεινής των χεριών έγινε με διαλέξεις και πρακτικά σεμινάρια πριν και κατά τη διάρκεια της μελέτης από την επιτροπή ελέγχου νοσοκομειακών λοιμώξεων και από εξειδικευμένους λοιμωξιολόγους του νοσοκομείου μας.

Στα σεμινάρια αυτά, τονίστηκε ο ρόλος των επαφών των επαγγελματιών υγείας με τους ασθενείς στη διασπορά μικροβίων μεταξύ των νοσηλευόμενων και η υψηλή σημασία της υγιεινής των χεριών στον περιορισμό των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Έγινε εκπαίδευση του σωστού τρόπου πλυσίματος των χεριών και του τρόπου χρησιμοποίησης των αντισηπτικών διαλυμάτων. Πραγματοποιήθηκαν σεμινάρια επίδειξης των χειρισμών και επαφών με τους ασθενείς που επιβάλλουν την εφαρμογή της υγιεινής των χεριών. Συγκεκριμένα, το προσωπικό εκπαιδεύτηκε στην εφαρμογή των κανόνων της υγιεινής των χεριών πριν από οποιαδήποτε επαφή με τον ασθενή, πριν από μία άσηπτη διαδικασία, μετά την επαφή με πιθανές μολυσματικές εκκρίσεις, μετά από οποιαδήποτε επαφή με τον ασθενή και μετά την επαφή με το άψυχο περιβάλλον του ασθενούς (τα «πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών»). Επιπλέον, το προσωπικό της Κλινικής εκπαιδεύτηκε να εφαρμόζει την υγιεινή των

χεριών για όλους τους ασθενείς και σε όλους τους χώρους. Τονίστηκε, τέλος, ότι η υγιεινή των χεριών πρέπει να εφαρμόζεται παρά την κλίνη και στο σημείο φροντίδας του ασθενούς ανεξάρτητα από την χρήση γαντιών. Η εκπαίδευση στηρίχτηκε στον οδηγό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για την προώθηση της υγιεινής των χεριών (WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care, <http://www.who.int/gpsc/5may/tools/9789241597906/en/>).

ΤΑ 5 ΒΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΧΕΡΙΩΝ



1	Πριν από την επαφή με τον ασθενή	ΠΟΤΕ; ΓΙΑΤΙ;	Εφάρμοσε την υγιεινή των χεριών πριν αγγίξεις τον ασθενή. Για να τον προστατεύεις από τα παθογόνα μικρόβια που μεταφέρονται με τα χέρια σου.
2	Πριν από κάθε καθαρό ή άσηπτο χειρισμό	ΠΟΤΕ; ΓΙΑΤΙ;	Εφάρμοσε την υγιεινή των χεριών αμέσως ΠΡΙΝ από κάθε καθαρή ή άσηπτη διαδικασία Για να προστατεύσεις τον ασθενή από μεταφορά μικροβίων που αποικίζουν εσένα και τον ίδιο και μπορούν να γίνουν παθογόνα εάν εισέλθουν στην κυκλοφορία του.
3	Μετά από την έκθεση σε σωματικά υγρά του ασθενή	ΠΟΤΕ; ΓΙΑΤΙ;	Εφάρμοσε την υγιεινή των χεριών αμέσως ΜΕΤΑ από κίνδυνο έκθεσης σε σωματικά υγρά του ασθενή (και αμέσως μετά την απόρριψη των γαντιών). Για να προστατεύσεις τον εαυτό σου και το επαγγελματικό σου περιβάλλον από τα παθογόνα μικρόβια του ασθενή.
4	Μετά από την επαφή με τον ασθενή	ΠΟΤΕ; ΓΙΑΤΙ;	Εφάρμοσε την υγιεινή των χεριών μετά την επαφή με τον ασθενή και το άμεσο περιβάλλον του. Για να προστατεύσεις τον εαυτό σου και το επαγγελματικό σου περιβάλλον από τα παθογόνα μικρόβια του ασθενή.
5	Μετά από την επαφή με το άμεσο άψυχο περιβάλλον του ασθενή	ΠΟΤΕ; ΓΙΑΤΙ;	Εφάρμοσε την υγιεινή των χεριών εφόσον αγγίξεις αντικείμενα ή έπιπλα που βρίσκονται στο άμεσο άψυχο περιβάλλον του ασθενή, ακόμα και αν δεν έχεις αγγίξει τον ίδιο. Για να προστατεύσεις τον εαυτό σου και το επαγγελματικό σου περιβάλλον από τα παθογόνα μικρόβια του ασθενή.

Εικόνα 27 – Τα πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών

2.3.6 Πρόγραμμα περιορισμού της χρήσης των αντιβιοτικών

Στα πλαίσια ελέγχου των λοιμώξεων του νοσοκομείου, εφαρμόζεται από τον Οκτώβριο του 2010 ένα πρόγραμμα περιορισμού της χρήσης των αντιμικροβιακών παραγόντων. Στο πρόγραμμα αυτό συμμετέχουν το Μικροβιολογικό Εργαστήριο, το Τμήμα Φαρμακείου, η Επιτροπή ελέγχου λοιμώξεων και οι λοιμωξιολόγοι του νοσοκομείου. Το Μικροβιολογικό Εργαστήριο είναι υπεύθυνο για την ενημέρωση των κλινικών ιατρών για τη σωστή λήψη κατάλληλων δειγμάτων για καλλιέργεια κατά περίπτωση. Επιπλέον, το Μικροβιολογικό Εργαστήριο είναι υπεύθυνο για την συνεχή καταγραφή και την τακτική ενημέρωση των κλινικών ιατρών για την τρέχουσα αντοχή των συχνότερα απομονωμένων βακτηρίων και την διαχρονική εξέλιξη της αντοχής τους, στις διάφορες κατηγορίες ασθενών.

Το Φαρμακευτικό τμήμα διαδραματίζει ένα ρόλο κλειδί στην πολιτική χρήσης αντιβιοτικών, που αφορά τον έλεγχο της κατανάλωσης των προωθημένων αντιβιοτικών από τις διάφορες κλινικές του νοσοκομείου. Τα υπό περιορισμό αντιβιοτικά του προγράμματος περιλαμβάνουν τις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη και δοριπενέμη), την κολιστίνη, την τυγκεκυκλίνη και την

φωσφομυκίνη. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον περιορισμό των προωθημένων αντιβιοτικών είναι η επιτήρηση σε μόνιμη βάση της συμπλήρωσης των εντύπων για τα προωθημένα αντιβιοτικά, καθώς και των ειδικών εντύπων στα οποία αναγράφεται η χημειοπροφύλαξη στις περιπτώσεις χειρουργικών επεμβάσεων. Τα έντυπα αυτά θα πρέπει να είναι πλήρως συμπληρωμένα (ημερομηνία εισαγωγής του ασθενούς, πάθηση, πλήρης αιτιολόγηση της συνταγογράφησης του προωθημένου αντιβιοτικού, συμπλήρωση της αντιβιογράμματος που είναι ενσωματωμένο στο έντυπο στις περιπτώσεις που έχει απομονωθεί ο αντίστοιχος μικροοργανισμός) από τον υπεύθυνο για τον συγκεκριμένο ασθενή γιατρό και να είναι υπογεγραμμένα από τον υπεύθυνο για τη συγκεκριμένη κλινική λοιμωξιολόγο. Σε περίπτωση που δεν τηρούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις το Φαρμακευτικό τμήμα οφείλει να μην χορηγεί τα αιτούμενα από τις κλινικές προωθημένα αντιβιοτικά.

2.3.7 Επίβλεψη της συμμόρφωσης με την δέσμη μέτρων

Η ερευνητική ομάδα ήταν υπεύθυνη για την επίβλεψη και την καταγραφή της τήρησης των προτεινόμενων μέτρων καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Στο τέλος της ερευνητικής περιόδου εξετάστηκε το ποσοστό των εισαχθέντων στην Κλινική ασθενών που ελέγχθηκε με καλλιέργειες φορείας. Συγκεκριμένα μέλη της ομάδας ανέλαβαν την επίβλεψη της εφαρμογής της υγιεινής των χεριών και τη συμμόρφωση με τα υπόλοιπα μέτρα (διαχωρισμός φορέων, μέτρα επαφής, απολύμανση περιβάλλοντος, αποκλειστικό νοσηλευτικό προσωπικό για τους φορείς) με καθημερινές επισκέψεις στη Κλινική.

Ειδικότερα, ο έλεγχος για τη συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών στηρίχθηκε σε παρατηρήσεις διάρκειας 20-30 λεπτών από εκπαιδευμένο παρατηρητή

που κατέγραφε τις δραστηριότητες των επαγγελματιών υγείας. Πιο συγκεκριμένα, ο παρατηρητής κατέγραφε τις ευκαιρίες για υγιεινή των χεριών και τις αντίστοιχες ενέργειες του προσωπικού, βάσει της στρατηγικής του ΠΟΥ για την υγιεινή των χεριών (My 5 Moments for Hand Hygiene). Το έντυπο που χρησιμοποιήθηκε παρατίθεται ακολούθως (Εικόνα 28). Για την καταγραφή της συμμόρφωσης με τα λοιπά μέτρα επαφής χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστό έντυπο (Εικόνα 29). Τέλος, το Τμήμα Φαρμακείου του νοσοκομείου ήταν υπεύθυνο για την συνέχιση της εφαρμογής του ήδη ισχύοντος προγράμματος για τον περιορισμό των προωθημένων αντιβιοτικών.



Observation Form

Facility:		Period Number*:		Session Number*:	
Service:		Date: (dd/mm/yy)	/ /	Observer: (initials)	
Ward:		Start/End time: (hh:mm)	: / :	Page N°:	
Department:		Session duration: (mm)		City**:	
Country**:					

Prof. cat Code N°	Indication	HH Action	Prof. cat Code N°	Indication	HH Action	Prof. cat Code N°	Indication	HH Action	Prof. cat Code N°	Indication	HH Action
1	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	1	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	1	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	1	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
2	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	2	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	2	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	2	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
3	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	3	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	3	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	3	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
4	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	4	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	4	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	4	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
5	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	5	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	5	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	5	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
6	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	6	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	6	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	6	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
7	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	7	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	7	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	7	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves
8	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	8	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	8	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves	8	<input type="checkbox"/> bef-pat. <input type="checkbox"/> bef-asept. <input type="checkbox"/> aft-b.f. <input type="checkbox"/> aft-pat. <input type="checkbox"/> aft.p.surr.	<input type="checkbox"/> HR <input type="checkbox"/> HW <input type="radio"/> missed ○ gloves

* To be completed by the data manager.

** Optional, to be used if appropriate, according to the local needs and regulations.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this document. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.
WHO acknowledges the Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG), in particular the members of the Infection Control Programme, for their active participation in developing this material.
Revised August 2009

Εικόνα 28 – Έντυπο του ΠΟΥ καταγραφής με τη συμμόρφωση των χεριών

ΑΣΘΕΝΗΣ:

Ημερομηνία	Φυσικός διαχωρισμός	Αφοσιωμένο Νοσηλευτικό Προσωπικό			Γάντια/ Ποδιές	Σήμανση
		1 ^η	2 ^η	3 ^η		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						

Εικόνα 29 – Έντυπο καταγραφής συμμόρφωσης με τα μέτρα επαφής

2.4 Μικροβιολογική επιτήρηση CP-Kp αποικισμένων

2.4.1 Απομόνωση και Ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Για τη δειγματοληψία ελέγχου φορέας χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί, οι οποίοι διυγραίνονταν με 2-3 σταγόνες διαλύματος 0.9% NaCl. Για κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκαν δύο στυλεοί, ένας για κάθε θέση ελέγχου (ορθό και φάρυγγας), οι οποίοι μεταφέρονταν στο μικροβιολογικό εργαστήριο μέσα σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα σε διάστημα που δεν υπερέβαινε τα 30 λεπτά. Όλα τα δείγματα εμβολιάζονταν άμεσα σε διάφορο-διαχωριστικό θρεπτικό υλικό για Gram αρνητικά βακτήρια, το MacConkey άγαρ Νο 3 εμπλουτισμένο με μεροπενέμη (0.5 mg/L). Μετά από 48ωρη επώαση στους 37°C ακολουθούσε απομόνωση των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε MacConkey άγαρ για την τελική αξιολόγηση τους. Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα Crystal. Όλα τα στελέχη *K.pneumoniae* που ταυτοποιήθηκαν φυλάσσονταν σε skimmed milk στους σε κατάψυξη ρυθμισμένη στους -80°C για περαιτέρω επεξεργασία.

Παράλληλα, υπήρχε διαρκής ενημέρωση από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του νοσοκομείου και στην περίπτωση λοιμώξεων σε ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής από ανθεκτικά στις καρβαπεμέμες στελέχη *K.pneumoniae*, τα υπεύθυνα στελέχη συλλέγονταν και φυλλάσσονταν επίσης στους -80°C για περαιτέρω επεξεργασία.

2.4.2 Φαινοτυπικός έλεγχος για την παρουσία καρβαπενεμάσης

Όλα τα στελέχη *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν από τα δείγματα ελέγχου φορείας και τα αντίστοιχα των λοιμώξεων εξετάστηκαν για την παραγωγή καρβαπενεμασών με φαινοτυπικές μεθόδους. Η παρουσία καρβαπενεμάσης ελέγχθηκε αρχικά με το τροποποιημένο τεστ Hodge (MHT) χρησιμοποιώντας το πρότυπο στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 ως στέλεχος δείκτη και δισκία μεροπενέμης 10 mg. Ετοιμάστηκε εναιώρημα θολερότητας 0.5 της κλίμακας McFarland από το στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 σε φυσιολογικό ορό. Το εναιώρημα της *E. coli* ATCC 25922 ενοφθαλμίστηκε σε τετράγωνο τρυβλίο Mueller-Hinton άγαρ και στη συνέχεια τοποθετήθηκε ο δίσκος της μεροπενέμης. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας κρίκο ελήφθησαν 5 περίπου αποικίες από το υπό εξέταση στέλεχος, που προηγουμένως αναπτύχθηκε σε MacConkey άγαρ, και ενοφθαλμίστηκαν σε μία ευθεία γραμμή ξεκινώντας από την περιφέρεια του δίσκου μεροπενέμης έως την άκρη του τρυβλίου. Μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες, το τρυβλίο εξετάστηκε για παραμόρφωση της ζώνης αναστολής της *E. coli* στο σημείο τομής της γραμμής με το υπό εξέταση στέλεχος. Όταν παρατηρήθηκε παραμόρφωση, το τεστ θεωρήθηκε θετικό για την παρουσία καρβαπενεμάσης.

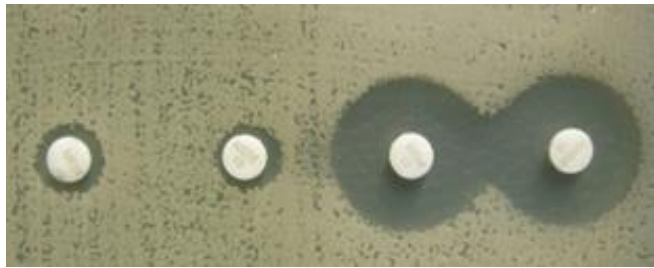
Για τα στελέχη *K.pneumoniae* με θετικό Hodge τεστ εφαρμόστηκε η δοκιμασία διπλού συνδυασμού δίσκων μεροπενέμης με τους αναστολείς βορονικό οξύ και EDTA. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε πάνω σε τετράγωνα τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ, όπου ενοφθαλμίστηκε βακτηριακό εναιώρημα 0.5 McFarland του υπό εξέταση στελέχους *K.pneumoniae*. Στη συνέχεια, έγινε η τοποθέτηση των δίσκων μεροπενέμης μόνη της και με αναστολείς καρβαπενεμασών με την εξής σειρά: δίσκος μεροπενέμης, δίσκος μεροπενέμης με ενστάλαξη 10 μl EDTA 0.1 M, δίσκος μεροπενέμης με ενστάλαξη 20 μl διαλύματος βορονικού οξέος συγκέντρωσης

20 mg/ml και δίσκος μεροπενέμης με συνδυασμό των παραπάνω ποσοτήτων EDTA και βορονικού. Η επώαση διαρκούσε 24 ώρες στους 37°C . Το τεστ θεωρείται θετικό για παραγωγή MBL εάν η ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο της μεροπενέμης με το EDTA μεγαλώνει. λόγω της ανασταλτικής δράσης του EDTA στη μεταλλο-β-λακταμάση κατά $\geq 5\text{mm}$ περισσότερο σε σχέση με τη διάμετρο γύρω από τη σκέτη μεροπενέμη. Το τεστ θεωρείται θετικό για παραγωγή KPC ενζύμου όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο που περιείχε το αντιβιοτικό μαζί με το βορονικό οξύ είναι $\geq 5\text{mm}$ από τη διάμετρο της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο που περιείχε μόνο αντιβιοτικό. Τέλος, η δοκιμασία είναι ενδεικτική για ταυτόχρονη παραγωγή KPC και MBL καρβαπενεμάσης, όταν η ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο μεροπενέμης και συνδυασμού των δύο αναστολέων ήταν μεγαλύτερη κατά $\geq 5\text{mm}$ και από τα τρία υπόλοιπα δισκία (Εικόνα 30).

A



B



C



D



Εικόνα 30 - Combined-disc test

A: Το υπό εξέταση στέλεχος είναι ευαίσθητο στις καρβαπενέμες και η διάμετρος αναστολής δεν επηρεάζεται από την παρουσία EDTA και BA.

B: Το υπό εξέταση στέλεχος είναι ανθεκτικό στις καρβαπενέμες. Η διάμετρος αναστολής είναι $\geq 5\text{mm}$ παρουσία BA και δεν επηρεάζεται από την παρουσία EDTA, οπότε παράγει καρβαπενεμάση τύπου KPC.

C: Το υπό εξέταση στέλεχος είναι ανθεκτικό στις καρβαπενέμες. Η διάμετρος αναστολής είναι $\geq 5\text{mm}$ παρουσία EDTA και δεν επηρεάζεται από την παρουσία BA, οπότε παράγει καρβαπενεμάση τύπου MBL.

D: Το υπό εξέταση στέλεχος είναι ανθεκτικό στις καρβαπενέμες. Η διάμετρος αναστολής είναι $\geq 5\text{mm}$ παρουσία συγχρόνως EDTA και BA από τους δίσκους με καρβαπενέμη, καρβαπενέμη + EDTA και καρβαπενέμη + BA, οπότε παράγει καρβαπενεμάσες τύπου KPC και MBL.

2.4.3 Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμάσης

2.4.3.1 Απομόνωση μικροβιακού DNA

Αρχικά τα στελέχη *K.pneumoniae* που απομονώθηκαν από τα δείγματα φορείας και τις λοιμώξεις των ασθενών υποβλήθηκαν σε κυτταρόλυση με χρήση του QIAamp® DNA Mini Kit της QIAGEN, West Sussex, U.K., οπότε έγινε απομόνωση του καθαρού μικροβιακού DNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Τα μικρόβια ανακαλλιεργούνταν σε McConkey άγαρ για 24 ώρες. Με αποστειρωμένο στυλέο συλλέγονταν 10 αποικίες από το καλλιέργημα και εναιωρούνταν σε 180μl διαλύματος ATL. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη πρωτεΐνάσης K 20μl, ανάμειξη και επώαση σε θερμοκρασία 56°C για 2-3 ώρες. Έπειτα ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος AL 200μL, ανάμειξη και επώαση σε θερμοκρασία 70°C για 10 min. Τέλος, γινόταν προσθήκη 200μL αιθανόλης (100%). Αυτό το μείγμα μεταφερόταν στις ειδικές κολώνες (spin columns), γινόταν φυγοκέντρωση σε 8000rpm για 1min και απόρριψη του διηθήματος. Η διαδικασία στη συνέχεια περιελάμβανε δύο διαδοχικές εκπλύσεις και φυγοκεντρήσεις με τα ρυθμιστικά διαλύματα AW1 και AW2. Στο τέλος γινόταν προσθήκη 200μl διαλύματος AE και φυγοκέντρωση. Το τελικό διήθημα περιείχε το μικροβιακό DNA και φυλασσόταν σε θερμοκρασία -20°C.

2.4.3.2 Ενίσχυση των γονιδίων KPC, VIM και NDM με PCR

Μετά την απομόνωση του μικροβιακού DNA, έγινε σε όλα τα δείγματα PCR για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών των τύπων KPC, VIM και NDM (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} και *bla*_{NDM}), με τη χρησιμοποίηση ανάλογων εκκινητών (primers). Έτσι για το *bla*_{VIM}, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές VIM-F (5'-AGT GGT

GAG TAT CCG ACA G-3') και VIM-R (5' - ATG AAA GTG CGT GGA GAC -3') με προϊόν PCR-VIM 250bp. Για το *bla*_{KPC} χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές KPC-F (5' - ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT -3') και KPC-R (5' - TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC -3') με προϊόν PCR-KPC 893bp. Για το *bla*_{NDM} χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές NDM-F (5' - GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC -3') και NDM-R (5' - CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC -3') με προϊόν PCR-NDM 621bp.

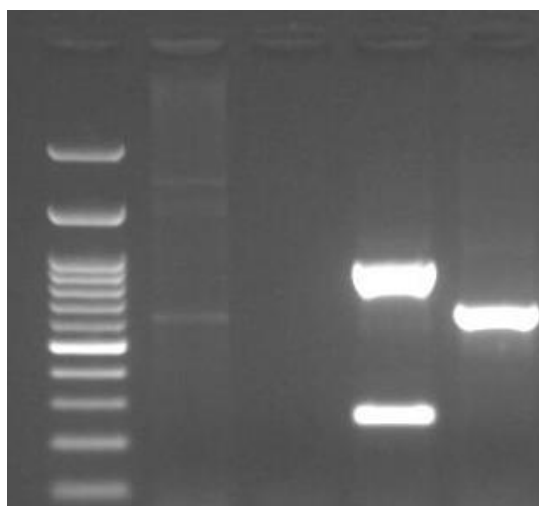
Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 5μl από το διάλυμα της κυτταρόλυσης, τα οποία τοποθετήθηκαν σε 45μl διαλύματος που περιείχε 1,25 μονάδες Taq πολυμεράσης με 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Taq πολυμεράσης (10X), εκκινητές 2μM, νουκλεοτίδια dNTPs: 0,2mM και MgCl₂: 1,5mM. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αρχική αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 3 λεπτά και ακολούθησαν 30 κύκλοι αντίδρασης που ο καθένας από αυτούς περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

- Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 3 λεπτά
- Αποδιάταξη DNA (denaturation): 94°C για 1 λεπτό
- Σύνδεση εκκινητή-υποστρώματος (annealing): 55°C για 1 λεπτό
- Σύνθεση DNA (extension): 72°C για 5 λεπτά

Για 30 κύκλους

2.4.3.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτική αγαρόζη

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης σε TBE (TBE 5X: 0,01M EDTA, pH=8, 0,44M Trizma-base, 0,44M boric acid) επί 90 λεπτά σε 100 Volts, με βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,4mg/l. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 2%. Για τον υπολογισμό του μεγέθους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν κλίμακες DNA (ladder) με διαβαθμίσεις 100 και 500 bp.



Εικόνα 31 - Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2% των προϊόντων multiplex PCR
 Θέση 1: 50μg/500μl 100bp DNA MW marker, Θέση 2: αρνητικός μάρτυρας, Θέση 3: κενή θέση,
 Θέση 4: KPC (893bp) and VIM (250bp), Θέση 5: NDM (621bp)

2.4.4 Τυποποίηση στελεχών με PFGE

Η κλωνικότητα των απομονωθέντων στελεχών εξετάστηκε με τη μέθοδο pulse field gel electrophoresis (PFGE) του γονιδιώματος των στελεχών κατόπιν κατατμήσεως με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI*, όπως περιγράφεται από τον Romesh K.Gautam [376]. Έγινε δηλαδή μελέτη της γενετικής συσχέτισης των απομονωθέντων στελεχών.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην PFGE ήταν:

- Διάλυμα PIV (1.0 M NaCl, 10 Mm Tris, pH 7,6)
- Lysis buffer (6 Mm Tris, pH 7.6, 100 mM EDTA, 1.0 NaCl, 0.5% Brij-58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sarcosine, 20 μg/ml RNase, 1μg/ml lysozyme)
- Διάλυμα ESP (0.5 M EDTA, pH 9-9.5, 1% sarcosine, 100 μg/ml proteinase K)
- Διάλυμα TE (10 Mm Tris, pH 7.5, 1.0 mM EDTA)
- Διάλυμα 0.5 M EDTA

- Διάλυμα 1.0 M Tris

Κάθε στέλεχος ανακαλλιεργήθηκε σε 5ml ζωμό M-H (Mueller Hinton Broth). Μετά από επώαση 16 ωρών στους 37°C, έγινε φυγοκέντρηση και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 2ml διαλύματος PIV στο οποίο προστέθηκαν 2ml αγαρόζης 1.6%, χαμηλού σημείου τήξεως (low-melting agarose, Bio-rad), που διατηρούνταν σε ρευστή μορφή σε θερμοκρασία 60°C. Από το μίγμα αυτό που αναμίχθηκε ταχέως, δημιουργήθηκαν τρία εκμαγεία αγαρόζης (plugs). Στη συνέχεια, τα plugs τοποθετήθηκαν για μία περίπου ώρα στο ψυγείο, για να στερεοποιηθούν και κατόπιν επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C, σε σωληνάριο στο οποίο προστέθηκαν 3-5ml από το lysis buffer. Μετά από 24ωρη επώαση το lysis buffer αντικαταστάθηκε από 3-5ml διαλύματος ESP και το σωληνάριο επώαστηκε στους 50°C, για 24 ώρες. Τα κυτταρικά υπολείμματα και η δράση της πρωτεΐνωσης K εξουδετερώθηκαν με 5 πλυσίματα για 30min στους 37°C σε διάλυμα TE. Το ένα τρίτο από κάθε plug κόπηκε προσεκτικά με μαχαιρίδιο και επώαστηκε για 12-16 ώρες στους 37°C μαζί με το περιοριστικό ένζυμο *XbaI*.

Η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου πραγματοποιήθηκε στη συσκευή CHEF DR-III (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1% με αγαρόζη για Pulsed-field (Bio-rad) και η ηλεκτροφόρηση έγινε με τη χρησιμοποίηση διαλύματος 0.5 X TBE. Οι παράμετροι που ακολουθήθηκαν ήταν: αρχικός χρόνος: 5 sec, τελικός χρόνος: 40 sec, τάση: 6 V/cm, και χρόνος ηλεκτροφόρησης: 22h.

Ως μοριακός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο lambda ladder DNA standard (BioLabs). Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε για 30min σε δοχείο με 200ml απιονισμένο νερό, στο οποίο προστέθηκαν 100μl βρωμιούχο αιθίδιο και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Η κάθε ομάδα κλωνικότητας

περιελάμβανε στελέχη που είχαν μεταξύ τους χρωμοσωμική ομοιότητα >80%. Ακολούθησε καταγραφή δένδρογραμμάτων (Un-weighted pair group method with arithmetic means – UPGMA) με το ηλεκτρονικό σύστημα GelCompar I software (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

2.5 Συλλογή δεδομένων

Σε ηλεκτρονική βάση δεδομένων καταγράφησαν όλα τα δείγματα φορείας που ελήφθησαν από το Μάιο του 2011 έως και τον Ιούνιο του 2013, τα αποτελέσματα αυτών και τα χαρακτηριστικά των CP-Kp στελεχών που απομονώθηκαν (φαινοτυπικά και μοριακά). Σε ξεχωριστή ηλεκτρονική βάση, καταχωρήθηκαν οι νοσηλείες των ασθενών κατά το ίδιο χρονικό διάστημα με στοιχεία για τη διάρκεια της παραμονής στη μονάδα και τον εντοπισμό φορείας από τα αποτελέσματα των καλλιεργειών αποικισμού ή/και τεκμηριωμένης λοίμωξης από οποιοδήποτε παθογόνο και από CP-Kp στέλεχος μέσω της συνεχούς ενημέρωσης από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του νοσοκομείου. Συγκεντρώθηκαν, επίσης, δεδομένα για τις βακτηριαμιές από οποιοδήποτε παθογόνο και ξεχωριστά από CP-Kp στελέχη, που σημειώθηκαν στους ασθενείς της μονάδας αναδρομικά πριν από την εφαρμογή της δέσμης μέτρων της μελέτης από τον Ιανουάριο του 2010 έως τον Μάιο του 2011 και προοπτικά κατά την εφαρμογή των μέτρων από τον Ιούνιο του 2011 έως και τον Δεκέμβριο του 2014. Επιπρόσθετα, συγκεντρώθηκαν στοιχεία για την κατανάλωση αντιβιοτικών ουσιών στην Αιματολογική Κλινική σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακείου του νοσοκομείου αναδρομικά πριν από την παρέμβαση για το διάστημα από τον Ιανουάριο του 2010 έως και το Μάιο του 2011 και προοπτικά κατά την εφαρμογή των μέτρων από τον Ιούνιο του 2011 έως και τον Δεκέμβριο του 2014.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και καταγράφηκε η συμμόρφωση με τα προτεινόμενα μέτρα μέσω ειδικών παρατηρήσεων. Καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης, γινόταν έλεγχος του διαχωρισμού των αποικισμένων ασθενών από τους μη αποικισμένους μέσω απομόνωσης ή συννοσηλείας με άλλους φορείς, της ύπαρξης αποκλειστικού νοσηλευτή για τους φορείς στις τρεις βάρδιες νοσηλείας κατά τη διάρκεια της ημέρας και της εφαρμογής των μέτρων επαφής μέσω συμπλήρωσης ειδικής φόρμας από την προϊσταμένη νοσηλεύτρια της Κλινικής και με παρατηρήσεις από τους ερευνητές με τη χρήση ειδικού εντύπου (Εικόνα 29). Ειδικά για τον έλεγχο της συμμόρφωσης με την υγιεινή των χεριών, έγιναν παρατηρήσεις από τις νοσηλεύτριες λοιμώξεων του νοσοκομείου, χρησιμοποιώντας το προτεινόμενο έντυπο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Observation Form, Annex 34 of the Guide to Implementation, WHO 2007) (Εικόνα 28). Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη συμμόρφωση των επαγγελματιών υγείας με τα «πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών», όπως έχουν οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

2.6 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Ο βασικός στόχος της μελέτης είναι η αξιολόγηση της προτεινόμενης δέσμης μέτρων στον έλεγχο της διασποράς των CP-Kp μικροοργανισμών μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών στην Αιματολογική Κλινική. Η κύρια παράμετρος που θα αναλυθεί για το σκοπό αυτό είναι η **επίπτωση των μικροβιαμιών από CP-Kp στελέχη**. Επιπρόσθετα, θα αναλυθούν α) ο **επιπολασμός των CP-Kp αποικισμένων ασθενών**, β) ο **επιπολασμός των CP-Kp αποικισμένων ασθενών κατά την εισαγωγή**, γ) η **επίπτωση των νέων περιπτώσεων CP-Kp αποικισμού**, δ) η **κατανάλωση αντιβιοτικών στην Κλινική** και ε) η **επίπτωση των μικροβιαμιών**

από οποιοδήποτε παθογόνο. Δευτερευόντως, θα μελετηθεί η μοριακή επιδημιολογία των καρβαπενεμασών στην Κλινική.

Κάθε ασθενής που βρέθηκε θετικός στο πρώτο δείγμα αποικισμού εντός 24 ωρών από την εισαγωγή του στην Κλινική, θεωρήθηκε ήδη αποικισμένος. Έτσι, εκτιμήσαμε τον μηνιαίο επιπολασμό κατά την εισαγωγή με CP-Kp στελέχη ως την αναλογία των θετικών καλλιιεργειών φορείας στο σύνολο των δειγμάτων κατά την εισαγωγή κατά τη διάρκεια αυτού του μήνα. Επιπλέον, υπολογίσαμε τον μηνιαίο επιπολασμό με CP-Kp στελέχη ως την αναλογία των αποικισμένων ασθενών στο σύνολο των νοσηλευόμενων ασθενών, θεωρώντας αποικισμένους ασθενείς με ένα τουλάχιστον θετικό επίχρισμα φορείας. Εκτιμήσαμε την μετά την παρέμβαση κλίση της γραμμικής τάσης του μηνιαίου επιπολασμού κατά την εισαγωγή και κατά τη νοσηλεία χρησιμοποιώντας τη γραμμική παλινδρόμηση.

Η επίπτωση των νέων περιπτώσεων CP-Kp αποικισμού κατά τη νοσηλεία των ασθενών εκτιμήθηκε επίσης σε μηνιαία βάση. Μόνο οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί κατά την εισαγωγή και από τους οποίους ελήφθησαν τουλάχιστον δύο δείγματα ελέγχου (ένα κατά την εισαγωγή και ένα κατά τη διάρκεια της νοσηλείας) συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση της επίπτωσης. Ο ανθρωποχρόνος του κάθε ασθενούς (person-time) υπολογίστηκε για τους μεν αρνητικούς ως το χρονικό διάστημα μεταξύ εισαγωγής και εξόδου από την κλινική, για τους δε ασθενείς που αποικίστηκαν κατά την νοσηλεία τους ως το χρονικό διάστημα μεταξύ της εισαγωγής και του μέσου χρόνου μεταξύ του τελευταίου αρνητικού και του πρώτου θετικού δείγματος φορείας. Έτσι, η μηνιαία επίπτωση του αποικισμού υπολογίστηκε ως ο αριθμός των νέων περιπτώσεων αποικισμού κατά την νοσηλεία διαιρεμένου με τον συνολικό ανθρωποχρόνο σε κίνδυνο (person-time at risk).

Επιπρόσθετα, η επίπτωση των CP-Kp βακτηριαμιών ανά τρίμηνο εκφράστηκε σε νέες περιπτώσεις λοιμώξεων ανά τον συνολικό ανθρωποχρόνο σε κίνδυνο κατά την αντίστοιχη περίοδο. Όμοια, εκτιμήθηκε η επίπτωση των βακτηριαμιών από όλα τα παθογόνα. Δεδομένου ότι είχαμε στη διάθεσή μας στοιχεία για τις βακτηριαμιές στην κλινική για μεγάλη χρονική περίοδο πριν την εφαρμογή των μέτρων ελέγχου της διασποράς των CP-Kp στελεχών, αξιολογήθηκε ο αντίκτυπος της εφαρμοσθείσας δέσμης μέτρων χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία της τμηματικής γραμμικής παλινδρόμησης (segmented linear regression). Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει να εκτιμηθεί η μεταβολή στο επίπεδο της επίπτωσης των βακτηριαμιών αμέσως μετά την παρέμβαση και η διαφορά της κλίσης της επίπτωσης μεταξύ των δύο περιόδων της μελέτης.

Τέλος, η κατανάλωση αντιβιοτικών υπολογίστηκε και εκφράστηκε σε DDDs/100 ασθενείς-ημέρες (Daily Defined Doses, ημερήσιες καθορισμένες δόσεις).

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα STATA για Windows. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν αυτά με p value <0.05 .

3 Αποτελέσματα

3.1 Πληθυσμός της μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης περιλαμβάνει τους ασθενείς που εισήχθησαν διαδοχικά στην Αιματολογική Κλινική και πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής (Πίνακας 10) μεταξύ Ιουνίου 2011 και Δεκεμβρίου 2014, καθώς και τους ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Κλινική κατά τον σημειακό επιπολασμό που διεξήχθη στις 23-25/5/2011.

Στον αρχικό σημειακό επιπολασμό (23-25/5/2011), εξετάστηκαν για CP-Kp φορεία 28 ασθενείς που νοσηλεύονταν στην Κλινική το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ακολούθως, εισήχθησαν στην Κλινική 2.005 ασθενείς, 1.199 ασθενείς από τον Ιούνιο του 2011 έως και τον Ιούνιο του 2013 και 806 ασθενείς από τον Ιούλιο του 2013 έως και τον Δεκέμβριο του 2014. Η μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν 15 ημέρες και η διάμεση 9 ημέρες. Από τον Ιούνιο του 2011 έως τον Ιούνιο του 2013 εφαρμόστηκε το σύνολο της προτεινόμενης δέσμης μέτρων συμπεριλαμβανομένης της μικροβιολογικής επιτήρησης. Από τον Ιούλιο του 2013 έως τον Δεκέμβριο του 2014 τα προτεινόμενα μέτρα συνεχίστηκαν να εφαρμόζονται με την εξαίρεση της μικροβιολογικής επιτήρησης, αλλά με στενή παρακολούθηση των λοιμώξεων από CP-Kp στελέχη.

Η μικροβιολογική επιτήρηση αφορούσε στον έλεγχο για CP-Kp αποικισμό των ασθενών εντός 48 ωρών από την εισαγωγή τους και εβδομαδιαίως μέχρι την έξοδο από το νοσοκομείο για τη χρονική περίοδο από τον Ιούνιο του 2011 έως και το Δεκέμβριο του 2012. Στο χρονικό αυτό διάστημα, εξετάστηκαν ασθενείς από 918 εισαγωγές, από τους οποίους ελήφθησαν 2.185 δείγματα για έλεγχο αποικισμού με CP-Kp. Μεταξύ Ιανουαρίου 2013 και Ιουνίου 2013, η μικροβιολογική επιτήρηση

εφαρμόστηκε στους ασθενείς που εισάγονταν στην Κλινική μόνο εντός 48 ωρών κατά την εισαγωγή τους. Στο διάστημα αυτό, εξετάστηκαν ασθενείς από 253 εισαγωγές, από τους οποίους ελήφθησαν δείγματα ελέγχου φορέας κατά την είσοδο στην Κλινική, ενώ πραγματοποιήθηκαν και δύο σημειακοί επιπολασμοί στο σύνολο των νοσηλευόμενων ασθενών της Κλινικής (29/3/2013 και 10/6/2013). Συνολικά, καθ'όλη τη διάρκεια της μικροβιολογικής επιτήρησης (Μάιος 2011 – Ιούνιος 2013), εξετάστηκαν για CP-Kp φορέας και ελέγχονταν για αντίστοιχες λοιμώξεις ασθενείς από 1.199 εισαγωγές. Από τους ασθενείς αυτούς, ελήφθησαν συνολικά 2.507 δείγματα.

3.2 CP-Kp αποικισμοί και λοιμώξεις κατά την εφαρμογή των μέτρων

Ο αρχικός επιπολασμός που πραγματοποιήθηκε το Μάιο του 2011 (23-25/5/2011) ανέδειξε 8 αποικισμένους με CP-Kp στελέχη ασθενείς από τους 28 που εξετάστηκαν συνολικά (28.57%). Μεταξύ Ιουνίου 2011 και Ιουνίου 2013, αναδείχτηκαν 30 επιπλέον αποικισμένοι ασθενείς, 13 στην εισαγωγή και 17 κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Στους δύο επόμενους σημειακούς επιπολασμούς που πραγματοποιήθηκαν (29/3/2013 και 10/6/2013), βρέθηκαν θετικοί φορείς τρεις ασθενείς από τους συνολικά 18 νοσηλευόμενους (16.6%).

Από τους 38 συνολικά θετικούς ασθενείς, δέκα παρουσίασαν επεισόδιο μικροβιαμίας από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K.pneumoniae* σε κάποια από τις νοσηλείες τους (26.3%). Όλα τα περιστατικά βακτηριαμιών από πολυανθεκτικά στελέχη *K.pneumoniae* αφορούσαν αποικισμένους με CP-Kp στελέχη ασθενείς, ενώ κανένας από τους μη αποικισμένους ασθενείς δεν παρουσίασε μικροβιαμία από CP-Kp. Κανένα άλλο είδος λοίμωξης από CP-Kp δεν

τεκμηριώθηκε στο χρονικό διάστημα της μελέτης. Συγκεκριμένα, δύο αποικισμένοι ασθενείς παρουσίασαν ασυμπτωματική βακτηριουρία με στέλεχος CP-Kp και στα πτύελα ενός ακόμη αποικισμένου ασθενούς απομονώθηκε CP-Kp χωρίς να συνοδεύεται από κλινική ή/και ακτινολογική εικόνα πνευμονίας. Επίσης, CP-Kp στέλεχος απομονώθηκε στην καλλιέργεια άκρου μηριαίου καθετήρα που αφαιρέθηκε από αποικισμένο ασθενή, χωρίς όμως να απομονωθεί αντίστοιχο στέλεχος σε περιφερικό αίμα ή άλλο κλινικό δείγμα. Όλες αυτές οι περιπτώσεις θεωρήθηκαν αποικισμοί με CP-Kp στέλεχος και όχι αληθείς λοιμώξεις σε ήδη γνωστούς CP-Kp φορείς. Μία επιπλέον περίπτωση CP-Kp βακτηριαμίας σημειώθηκε μετά τον Ιούνιο του 2013 κατά το χρονικό διάστημα στο οποίο γινόταν επιτήρηση των λοιμώξεων και εφαρμογή όλων των μέτρων εκτός από την ενεργό μικροβιολογική επιτήρηση. Επτά από τους έντεκα ασθενείς που ανέπτυξαν CP-Kp βακτηριαμία κατέληξαν λόγω σήψης (63.6%).

3.3 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά CP-Kp στελεχών

Στελέχη *K.pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης απομονώθηκαν από 38 διαφορετικούς ασθενείς. Δεκαοκτώ από τους 38 αυτούς ασθενείς βρέθηκαν θετικοί για φορεία σε περισσότερες από μία νοσηλείες. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους 38 ασθενείς ήταν θετικά για την παρουσία καρβαπενεμάσης με το τροποποιημένο τεστ Hodge (MHT). Οι καρβαπενεμάσες που ανιχνεύτηκαν από τα στελέχη των αποικισμών, με τη φαινοτυπική δοκιμασία διπλού συνδυασμού δίσκων μεροπενέμης με τους αναστολείς βορονικό οξύ και EDTA, ήταν τύπου KPC (n=31) και MBL (n=8), ενώ σε ένα ασθενή βρέθηκε στέλεχος θετικό για KPC και MBL ταυτοχρόνως. Από δύο ασθενείς απομονώθηκαν δύο στελέχη αποικισμού (ένα KPC και ένα MBL)

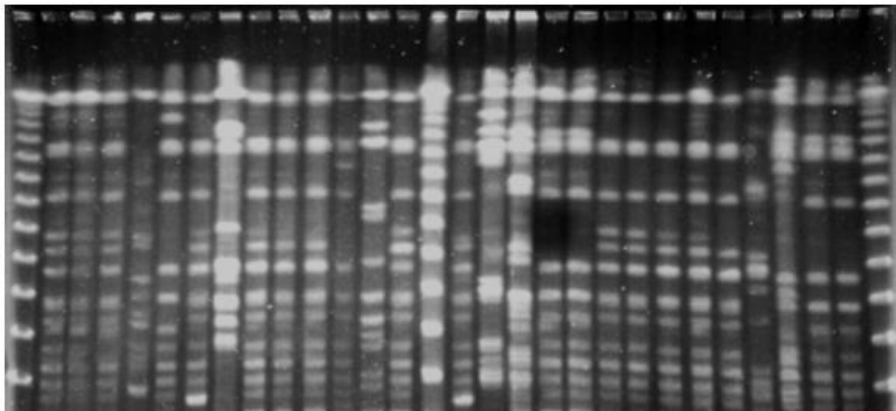
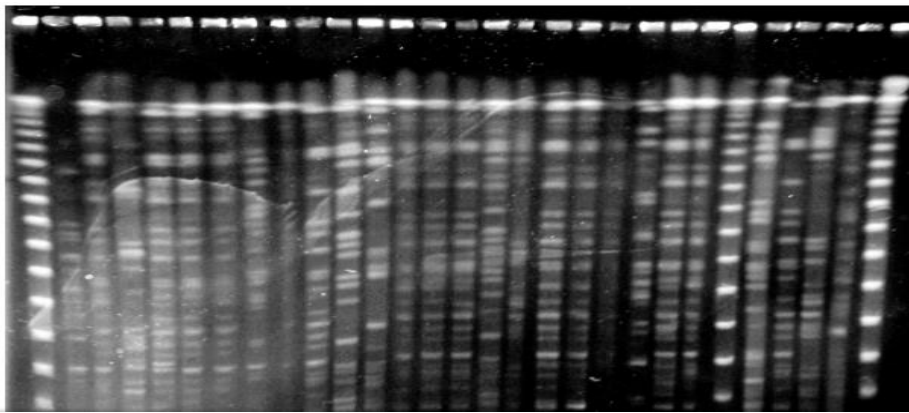
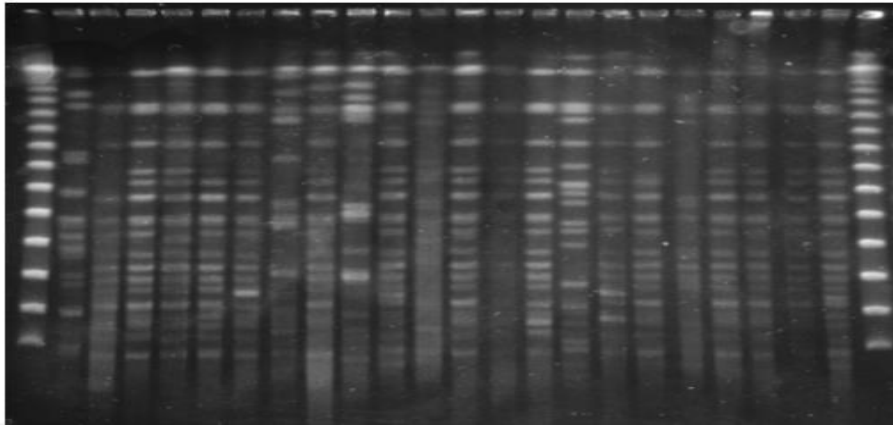
σε διαφορετικές νοσηλείες. Τα έντεκα στελέχη των CP-Kp βακτηριαμιών αφορούσαν 9 μικρόβια τύπου KPC και δύο τύπου MBL.

Ακολούθησε η μοριακή επιβεβαίωση της παρουσίας και του τύπου της καρβαπενεμάσης στα απομονωθέντα στελέχη με τη μεθοδολογία της multiplex PCR, όπως περιγράφηκε προηγούμενα. Οι 40 καρβαπενεμάσες που ανιχνεύτηκαν από τα στελέχη των αποικισμών ήταν τύπου KPC (n=31), VIM (n=7) και NDM (n=1), ενώ σε ένα ασθενή βρέθηκε στέλεχος θετικό για τα γονίδια *bla_{VIM}* και *bla_{KPC}* ταυτοχρόνως. Από δύο ασθενείς απομονώθηκαν δύο στελέχη αποικισμού (ένα KPC και ένα VIM) σε διαφορετικές νοσηλείες. Τα στελέχη των βακτηριαμιών αφορούσαν 9 μικρόβια τύπου KPC, ένα τύπου VIM και ένα τύπου NDM. Υπήρξε πλήρης συμφωνία μεταξύ φαινοτυπικής και μοριακής μεθοδολογίας ως προς το είδος της καρβαπενεμάσης για όλα τα απομονωθέντα στελέχη. Στις 11 περιπτώσεις των βακτηριαμιών, υπήρξε συμφωνία ως προς το είδος της καρβαπενεμάσης που παράγαγε το στέλεχος του αποικισμού και το υπεύθυνο για τη λοίμωξη στέλεχος.

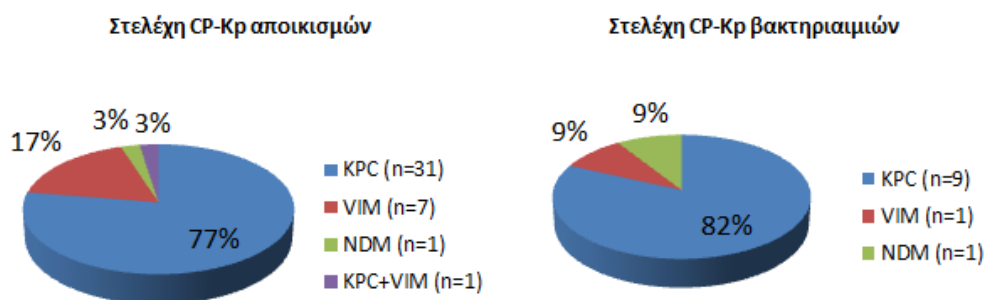
Μετά τη μοριακή επιβεβαίωση της παραγωγής καρβαπενεμασών από τα απομονωθέντα στελέχη φορείας και βακτηριαμιών, έγινε η τυποποίησή τους σε παλσότυπους με τη μέθοδο PFGE. Εξετάστηκαν συνολικά 67 CP-Kp στελέχη που απομονώθηκαν από τους 38 θετικούς ασθενείς. Πενήντα επτά από τα 67 στελέχη απομονώθηκαν από τον έλεγχο αποικισμού και τα υπόλοιπα δέκα προέρχονταν από τις CP-Kp βακτηριαμίες. Δεκαοκτώ από τους 38 θετικούς ασθενείς είχαν βρεθεί θετικοί για φορεία σε περισσότερες από μία νοσηλείες, οπότε σε αυτούς υπήρχε η δυνατότητα τυποποίησης και σύγκρισης του πρώτου και τελευταίου στελέχους αποικισμού. Από τα 67 CP-Kp στελέχη που τυποποιήθηκαν 54 παράγαγαν καρβαπενεμάση τύπου KPC, 9 καρβαπενεμάση τύπου VIM, 3 καρβαπενεμάση τύπου NDM και ένα στέλεχος έφερε ταυτοχρόνως *bla_{VIM}* και *bla_{KPC}* γονίδια.

Τα 67 CP-Kp στελέχη ταξινομήθηκαν σε 15 διαφορετικούς παλσότυπους (Α-Ο). Σε τρεις ασθενείς βρέθηκαν στελέχη αποικισμού που ανήκαν σε δύο διαφορετικούς παλσοτύπους. Οι δύο από αυτούς είναι οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν στελέχη με παραγωγή διαφορετικού τύπου καρβαπενεμάσης (KPC και VIM). Επομένως, οι υπόλοιποι 15 από τους 18 ασθενείς με περισσότερα από ένα απομονωθέντα στελέχη φορείας παρέμειναν κατά τη διάρκεια της μελέτης αποικισμένοι από το ίδιο βακτηριακό στέλεχος.

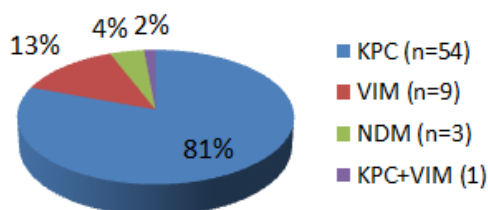
Η πλειοψηφία των KPC στελεχών ταξινομήθηκε στον ίδιο παλσότυπο, ενώ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ετερογένεια μεταξύ των MBL στελεχών. Συγκεκριμένα, τα 54 KPC στελέχη ταξινομήθηκαν σε επτά παλσοτύπους. Τα 46 από αυτά τα στελέχη ταξινομήθηκαν στον ίδιο παλσότυπο (Α), ενώ οι υπόλοιποι έξι παλσότυποι συμπεριέλαβαν ένα με δύο στελέχη. Τα 9 VIM στελέχη ταξινομήθηκαν σε επτά επίσης παλσοτύπους, καθένας από τους οποίους περιέλαβε ένα με δύο στελέχη. Τα τρία NDM στελέχη τυποποιήθηκαν σε έναν παλσότυπο, όπως και το στέλεχος που έφερε συγχρόνως *bla_{VIM}* και *bla_{KPC}* γονίδια. Υπήρξε ένας μόνο κοινός παλσότυπος μεταξύ μίας ομάδας KPC στελεχών και του θετικού στελέχους για *bla_{VIM}* και *bla_{KPC}* (Ε). Τέλος, τα δέκα στελέχη των βακτηριαμιών τυποποιήθηκαν στον ίδιο παλσότυπο με το αντίστοιχο στέλεχος αποικισμού, αποδεικνύοντας ότι το υπεύθυνο για τη λοίμωξη βακτηριακό στέλεχος ήταν το ίδιο με αυτό του αποικισμού.



Εικόνα 32 – Η τυποποίηση των 67 CP-Kr απομονωθέντων στελεχών με μεθοδολογία PFGE



Εικόνα 33 – Κατανομή των καρβαπενεμασών στα CP-Kr απομονωθέντα στελέχη



Εικόνα 34 – Κατανομή σε παλσοτύπους των 67 CP-Kr στελεχών

Πίνακας 11 – Τα χαρακτηριστικά των απομονωθέντων CP-Kr στελεχών

Microorganisms	Carbapenemase type				
	Site of isolation	KPC	VIM	NDM	KPC+VIM
Microorganisms	Rectum	31 { A (n=25) B (n=1) C (n=1) D (n=1) E (n=1) F (n=1) G (n=1)	7 { H(n=1) I(n=1) J(n=1) K(n=1) L(n=1) M(n=1) N(n=1)	1 { O(n=1)	1 { E(n=1)
	Blood	8 { A(n=8)	1 { M(n=1)	1 { O(n=1)	-

Τα γράμματα αντιστοιχούν στους PFGE τύπους και οι αριθμοί στο πλήθος των απομονωθέντων στελεχών. Όλες οι βακτηριαμίες οφείλονταν σε στελέχη με πανομοιότυπο PFGE τύπο με το στέλεχος αποικισμού.

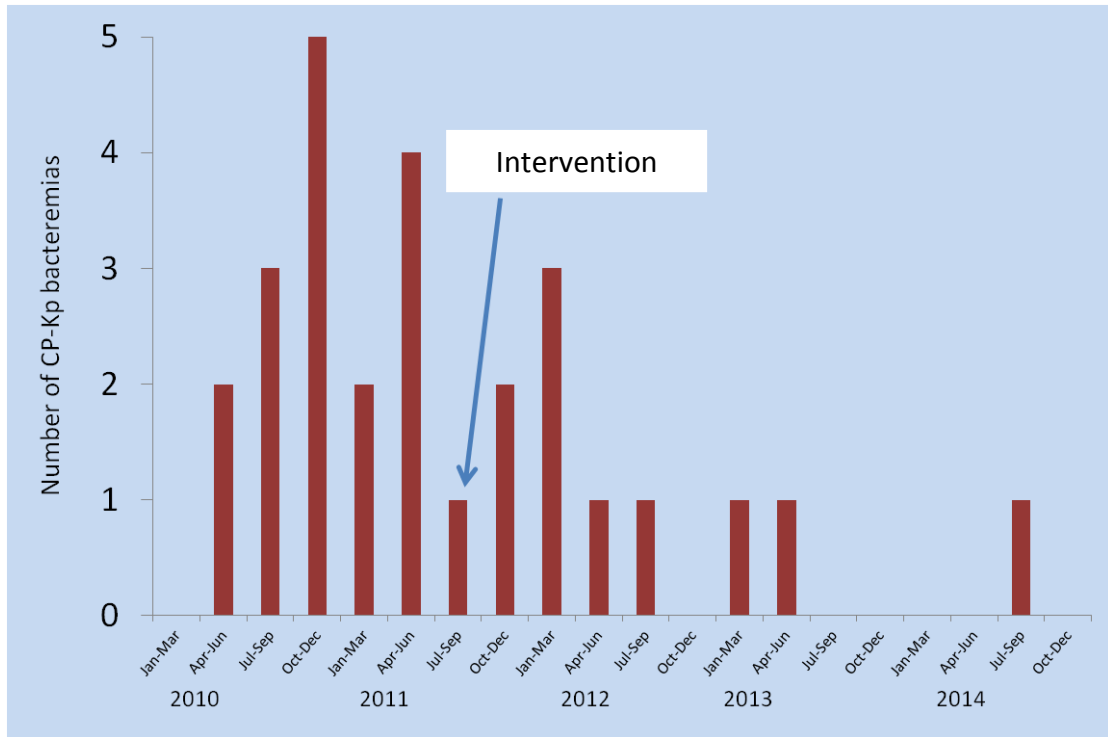
3.4 Βακτηριαμιές από CP-Kp στελέχη και από οποιοδήποτε παθογόνο πριν από και μετά την εφαρμογή της δέσμης μέτρων

Από το αρχείο του Μικροβιολογικού Τμήματος του νοσοκομείου, κατέστη δυνατή η καταγραφή των βακτηριαμιών από CP-Kp στελέχη και από οποιοδήποτε παθογόνο που σημειώθηκαν στην Αιματολογική Κλινική για χρονικό διάστημα 17 μηνών (Ιανουάριος 2010 – Μάιος 2011) πριν από την έναρξη της παρούσας μελέτης και για όλη τη χρονική περίοδο που διήρκησε η εφαρμογή της προτεινόμενης δέσμης μέτρων (Ιούνιος 2011 – Δεκέμβριος 2014). Τα δεδομένα των βακτηριαμιών παρουσιάζονται στον πίνακα 12 και στα διαγράμματα 1 και 2.

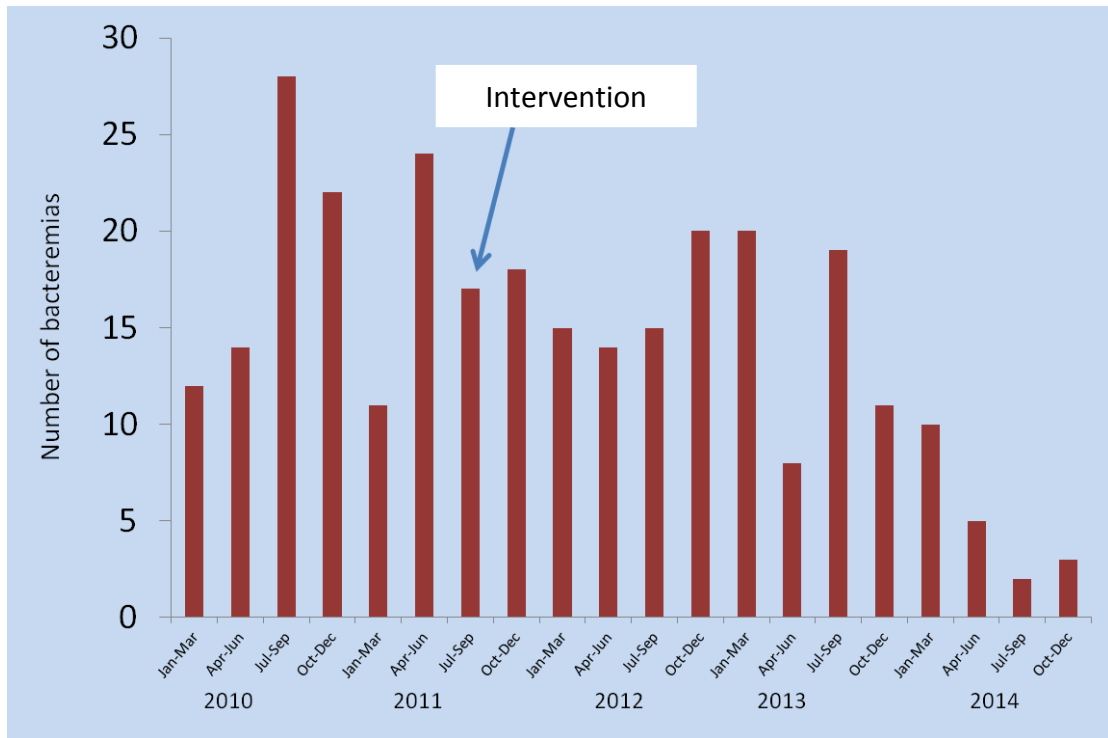
Πίνακας 12 - Αριθμός βακτηριαμιών ανά τρίμηνο πριν από και μετά την εφαρμογή των μέτρων

Τρίμηνο	Βακτηριαμιές από CP-Kp	Βακτηριαμιές από όλα τα παθογόνα
Ιανουάριος – Μάρτιος 2010	0	12
Απρίλιος – Ιούνιος	2	14
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	3	28
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	5	22
Ιανουάριος – Μάρτιος 2011	2	11
Απρίλιος – Ιούνιος	4	24
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	1	17
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	2	18
Ιανουάριος – Μάρτιος 2012	3	15
Απρίλιος – Ιούνιος	1	14
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	1	15
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	0	20
Ιανουάριος – Μάρτιος 2013	1	20
Απρίλιος – Ιούνιος	1	8
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	0	19
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	0	11
Ιανουάριος – Μάρτιος 2014	0	10
Απρίλιος – Ιούνιος	0	5
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	1	2
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	0	3

Διάγραμμα 1 - Αριθμός CP-Kp βακτηριαμιών ανά τρίμηνο πριν από και μετά την εφαρμογή των μέτρων



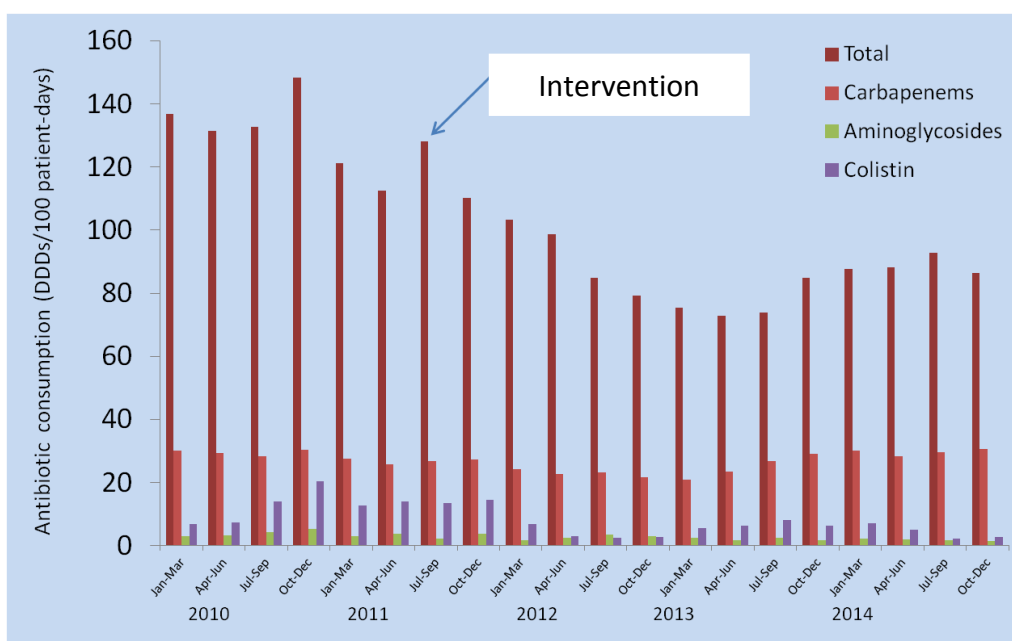
Διάγραμμα 2 - Αριθμός βακτηριαμιών από οποιοδήποτε παθογόνο ανά τρίμηνο πριν από και μετά την εφαρμογή των μέτρων



3.5 Κατανάλωση αντιβιοτικών πριν από και μετά την εφαρμογή της δέσμης μέτρων

Από το Τμήμα Φαρμακείου του νοσοκομείου συλλέχθηκαν στοιχεία για την κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών στην Αιματολογική Κλινική αναδρομικά για το διάστημα Ιανουάριος 2010 – Μάιος 2011 πριν από την εφαρμογή της δέσμης μέτρων και για όλη τη χρονική περίοδο που διήρκησε η εφαρμογή της προτεινόμενης δέσμης μέτρων (Ιούνιος 2011 – Δεκέμβριος 2014). Συγκεκριμένα, καταγράφησαν η συνολική κατανάλωση αντιβιοτικών και ξεχωριστά η κατανάλωση για τις καρβαπενέμες, τις αμινογλυκοσίδες και την κολιστίνη. Η κατανάλωση των αντιβιοτικών εκφράστηκε σε DDDs ανά 100 ασθενείς – ημέρες (Defined Daily Dosages, Καθορισμένες Ημερήσιες Δόσεις). Τα δεδομένα της κατανάλωσης αντιβιοτικών παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3 και στον πίνακα 13.

Διάγραμμα 3 - Κατανάλωση αντιβιοτικών σε DDDs/100 ασθενείς-ημέρες ανά τρίμηνο πριν από και μετά την εφαρμογή των μέτρων



Πίνακας 13 – Κατανάλωση αντιβιοτικών σε DDDs/100 ασθενείς-ημέρες ανά τρίμηνο πριν από και μετά την εφαρμογή των μέτρων

Τρίμηνο	Συνολική κατανάλωση	Καρβαπενέμες	Αμινογλυκοσίδες	Κολιστίνη
Ιανουάριος – Μάρτιος 2010	136.8	30.1	2.9	6.9
Απρίλιος – Ιούνιος	131.4	29.4	3.3	7.3
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	132.7	28.4	4.3	14.1
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	148.4	30.3	5.2	20.3
Ιανουάριος – Μάρτιος 2011	121.2	27.6	3.1	12.7
Απρίλιος – Ιούνιος	112.6	25.8	3.7	13.9
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	128.1	26.9	2.3	13.5
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	110.3	27.2	3.8	14.6
Ιανουάριος – Μάρτιος 2012	103.4	24.3	1.7	6.8
Απρίλιος – Ιούνιος	98.6	22.6	2.4	3.1
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	84.9	23.1	3.6	2.6
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	79.3	21.7	2.9	2.7
Ιανουάριος – Μάρτιος 2013	75.4	20.8	2.5	5.6
Απρίλιος – Ιούνιος	72.9	23.4	1.8	6.4
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	73.8	26.9	2.4	8.1
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	84.8	29.2	1.6	6.3
Ιανουάριος – Μάρτιος 2014	87.6	30.1	2.3	7.2
Απρίλιος – Ιούνιος	88.3	28.4	1.9	5.1
Ιούλιος – Σεπτέμβριος	92.9	29.7	1.7	2.3
Οκτώβριος - Δεκέμβριος	86.5	30.6	1.4	2.8

3.6 Συμμόρφωση με τη δέσμη μέτρων

Ο πληθυσμός της μελέτης συμπεριέλαβε ασθενείς από 1.199 διαδοχικές εισαγωγές κατά την περίοδο παρέμβασης με την προτεινόμενη δέσμη μέτρων (Μάιος 2011 – Ιούνιος 2013) με μέση διάρκεια νοσηλείας 15 ημερών και διάμεση περίοδο νοσηλείας 9 ημερών (συνολικά 18.276 ασθενείς-ημέρες). Συνολικά, ελήφθησαν 2.507 επιχρίσματα φορείας από τους νοσηλευόμενους ασθενείς.

Η συμμόρφωση με τις περισσότερες συνιστώσες της προτεινόμενης δέσμης μέτρων ήταν υψηλή. Παρατηρήθηκε 100% συμμόρφωση όσον αφορά το φυσικό διαχωρισμό των ασθενών-φορέων με απομόνωση ή συν-νοσηλεία με άλλους αποικισμένους ασθενείς αμέσως μετά την ενημέρωση από την ερευνητική ομάδα και σε κάθε επόμενη νοσηλεία του θετικού ασθενούς, καθώς και 100% συμμόρφωση με τα μέτρα επαφής. Αποκλειστικός νοσηλευτής για τους αποικισμένους ασθενείς υπήρχε μόνο στην πρωινή βάρδια. Η συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών ελέγχθηκε με παρατηρήσεις χρησιμοποιώντας το έντυπο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Εικόνα 28). Η μεθοδολογία βασίζεται στη συμμόρφωση των επαγγελματιών υγείας με τα *«πέντε βήματα της υγιεινής των χεριών»*. Πραγματοποιήθηκαν 200 παρατηρήσεις κατά μέσο όρο κάθε μήνα (συνολικά 4.029 παρατηρήσεις) (Πίνακας 14). Η συμμόρφωση του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού με την υγιεινή των χεριών ήταν 60% και 50% αντίστοιχα, ενώ η συμμόρφωση του βοηθητικού προσωπικού ήταν κάτω του 10% κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τέλος, υπήρχε πλήρης τήρηση του προγράμματος περιορισμού της χρήσης αντιβιοτικών του νοσοκομείου, κυρίως όσον αφορά στην χρήση των προωθημένων αντιβιοτικών.

Πίνακας 14 – Συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών

	ΙΑΤΡΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ	ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ	ΒΟΗΘΗΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΩΝ
Μάιος 2011	10%	23%	0%	211
Ιούνιος	23%	39%	0%	200
Ιούλιος	75%	72%	13%	168
Αύγουστος	70%	65%	0%	124
Σεπτέμβριος	33%	58%	10%	246
Οκτώβριος	60%	67%	0%	234
Νοέμβριος	67%	69%	0%	209
Δεκέμβριος	49%	57%	0%	197
Ιανουάριος 2012	69%	74%	10%	184
Φεβρουάριος	59%	63%	15%	225
Μάρτιος	83%	79%	20%	195
Απρίλιος	72%	60%	0%	203
Μάιος	63%	67%	25%	214
Ιούνιος	40%	39%	10%	207
Ιούλιος	60%	29%	0%	196
Αύγουστος	65%	20%	5%	202
Σεπτέμβριος	60%	18%	0%	195
Οκτώβριος	73%	22%	4%	198
Νοέμβριος	68%	15%	8%	208
Δεκέμβριος	77%	10%	5%	213

3.7 Αποτελεσματικότητα της δέσμης μέτρων

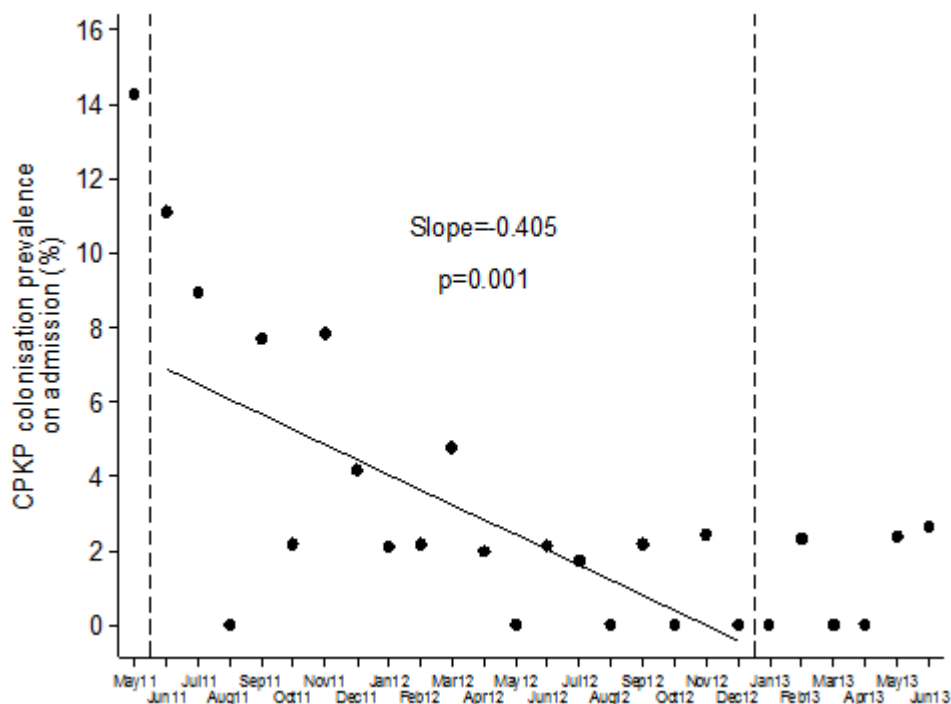
Ο σημειακός επιπολασμός του αποικισμού που διεξήχθη μία εβδομάδα πριν την εφαρμογή της δέσμης μέτρων ελέγχου της διασποράς των CP-Kp στελεχών στην Αιματολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό» (Μάιος 2011) ανέδειξε 8 αποικισμένους ασθενείς από τους 28 νοσηλευόμενους (28.6%). Συνεχής εισροή αποικισμένων ασθενών στην Κλινική παρατηρήθηκε κατά την περίοδο της παρέμβασης με τον μηνιαίο επιπολασμό της CP-Kp φορέας κατά την εισαγωγή να κυμαίνεται μεταξύ 0 και 11.1% (Διάγραμμα 4). Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση ανέδειξε σημαντική μείωση του μηνιαίου επιπολασμού της CP-Kp φορέας κατά την εισαγωγή (slope of linear trend [95% CI]: -0.405 [-0.627, -0.182], $p < 0.001$). (Διάγραμμα 4). Επιπρόσθετα, με την εφαρμογή της δέσμης μέτρων, ο μηνιαίος επιπολασμός του αποικισμού παρουσίασε προοδευτική μείωση από 15.9% τον Ιούνιο του 2011 σε 0% το Δεκέμβριο του 2012 (slope of linear trend [95% CI]: -0.576 [-0.863, -0.289], P value=0.001) (Διάγραμμα 5). Η επίπτωση του αποικισμού κατά τη νοσηλεία παρουσίασε τάση μείωσης από 10.6/1000 ασθενείς-ημέρες τον Ιούνιο του 2011 σε 0/1000 ασθενείς-ημέρες τον Δεκέμβριο του 2012 (slope of linear trend [95% CI]: -0.227 [-0.476, 0.023], $p = 0.072$) (Διάγραμμα 6).

Ο πιο σημαντικός αντίκτυπος της δέσμης μέτρων ήταν η αναχαίτιση της αυξητικής τάσης των CP-Kp βακτηριαμιών πριν την έναρξη της μελέτης. Συγκεκριμένα, η επίπτωση των βακτηριαμιών αυξανόταν πριν από την παρέμβαση, και από 0 για το διάστημα Ιανουάριος-Μάρτιος 2010 έφθασε το 1.58/1000 ασθενείς-ημέρες στο διάστημα Απριλίου-Ιουνίου 2011. Η παρέμβαση διέκοψε την παρατηρηθείσα αύξηση των CP-Kp βακτηριαμιών και η επίπτωση μειώθηκε από 1.58/1000 ασθενείς-ημέρες στην έναρξη της εφαρμογής των μέτρων, σε 0/1000

ασθενείς-ημέρες τον Ιούλιο του 2013 και διατηρήθηκε σε μηδενικά επίπεδα μέχρι το Δεκέμβριο του 2014 με την εξαίρεση ενός επεισοδίου βακτηριαμίας σε ασθενή που μεταφέρθηκε από άλλο νοσοκομείο. Η στατιστική ανάλυση της επίπτωσης των CP-Kp βακτηριαμιών έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση του επιπέδου και της κλίσης (coefficients [95% CI]: -1.545 [-2.388, -0.702] $p=0.001$ και -0.332 [-0.502, -0.162], $p<0.001$ αντίστοιχα) μεταξύ των δύο περιόδων (πριν από και μετά την εφαρμογή του προγράμματος ελέγχου) (Διάγραμμα 7). Επιπλέον, καταγράφηκε στατιστικά σημαντική μείωση βακτηριαμιών από οποιοδήποτε παθογόνο μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών (slope of linear trend in quarterly incidence post intervention [95% CI]: -0.150 (-0.231, -0.069], $p=0.012$) (Διάγραμμα 8).

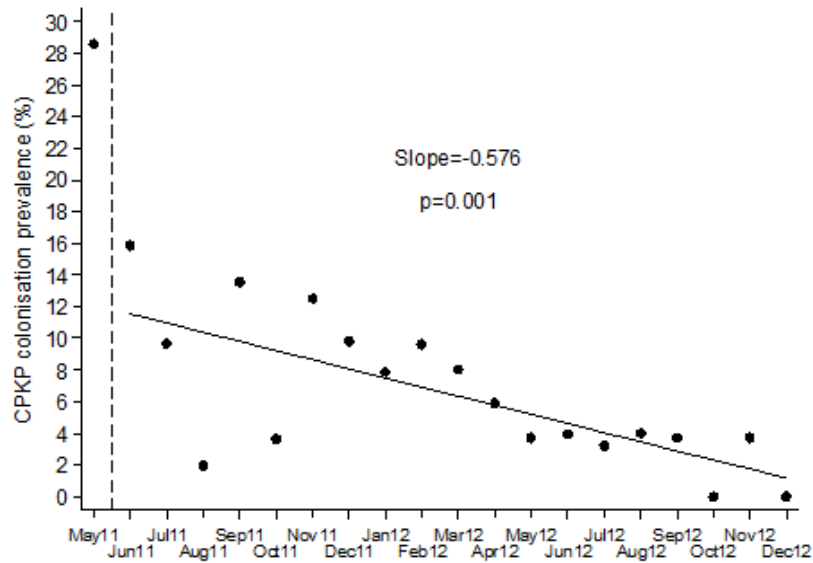
Η συνολική κατανάλωση αντιβιοτικών στην Κλινική μειώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p value <0.001) μεταξύ Ιανουαρίου 2010 και Δεκεμβρίου 2014. Όμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν για την κατανάλωση κολιστίνης (p value <0.01) και των αμινογλυκοσιδών (p value <0.001). Αντίθετα, η κατανάλωση καρβαπενεμών δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή (Διάγραμμα 9).

Διάγραμμα 4 - Μηνιαίος επιπολασμός αποικισμού κατά την εισαγωγή των ασθενών



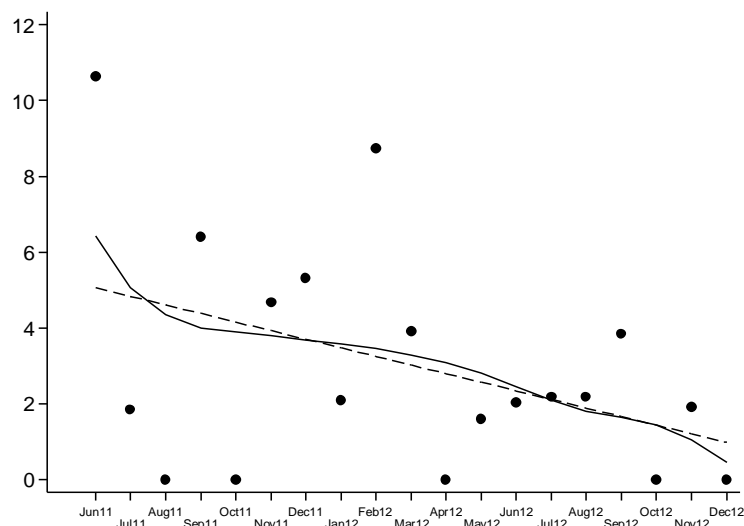
Μηνιαίος επιπολασμός του CP-Kp αποικισμού κατά την εισαγωγή κατά τη διάρκεια τριών περιόδων που υποδεικνύονται από τις κάθετες διακεκομμένες γραμμές: Μάιος 2011 (προ της παρέμβασης), Ιούνιος 2011-Δεκέμβριος 2012 (εφαρμογή μέτρων με μικροβιολογική επιτήρηση στην εισαγωγή και εβδομαδιαία) και Ιανουάριος 2013-Ιούνιος 2013 (εφαρμογή μέτρων με μικροβιολογική επιτήρηση μόνο στην εισαγωγή). Οι συμπαγείς κουκκίδες υποδηλώνουν τον μηνιαίο επιπολασμό κατά την εισαγωγή και η συνεχής γραμμή την προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης για την περίοδο Ιούνιος 2011-Δεκέμβριος 2012.

Διάγραμμα 5 - Μηνιαίος επιπολασμός αποικισμού των ασθενών



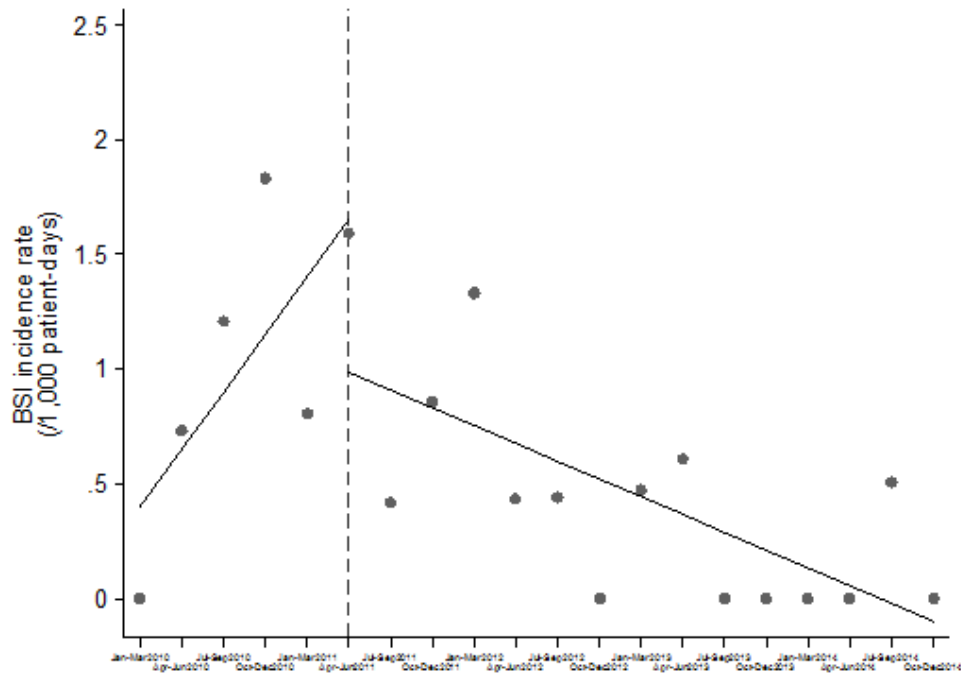
Η κάθετη διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνει την έναρξη της εφαρμογής της παρέμβασης με την δέσμη μέτρων (Ιούνιος 2011). Οι συμπαγείς κουκκίδες αντιστοιχούν στον μηνιαίο επιπολασμό και η συνεχής γραμμή στην προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης για την περίοδο Ιούνιος 2011-Δεκέμβριος 2012. Μετά το Δεκέμβριο του 2012, εκτιμήθηκε μόνο ο επιπολασμός κατά την εισαγωγή.

Διάγραμμα 6 - Μηνιαία επίπτωση αποικισμού



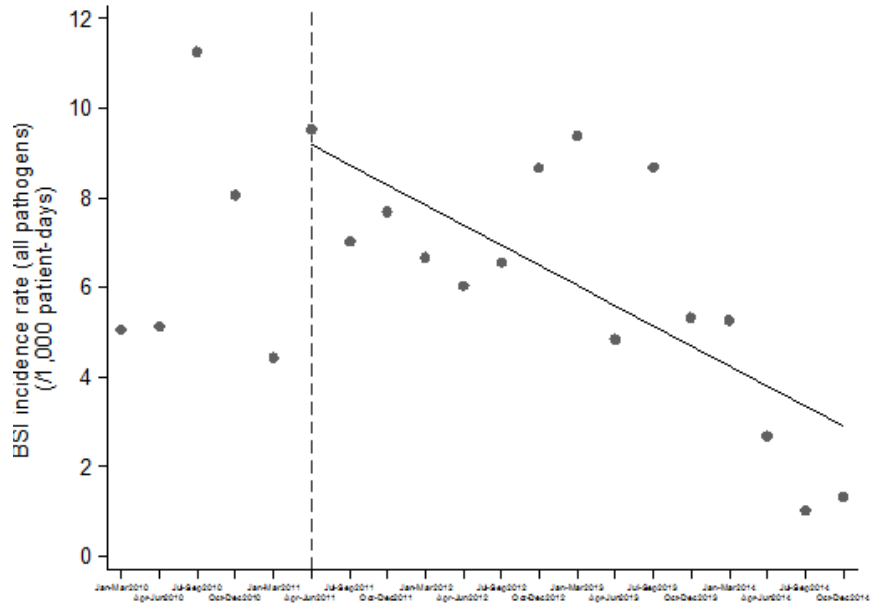
Οι συμπαγείς κουκκίδες αντιστοιχούν στην μηνιαία επίπτωση του αποικισμού. Η σταθερή γραμμή αντιστοιχεί στην γραμμή εξομάλυνσης και η διακεκομμένη γραμμή στην προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης.

Διάγραμμα 7 - Τρίμηνη επίπτωση CP-Kp βακτηριαμιών



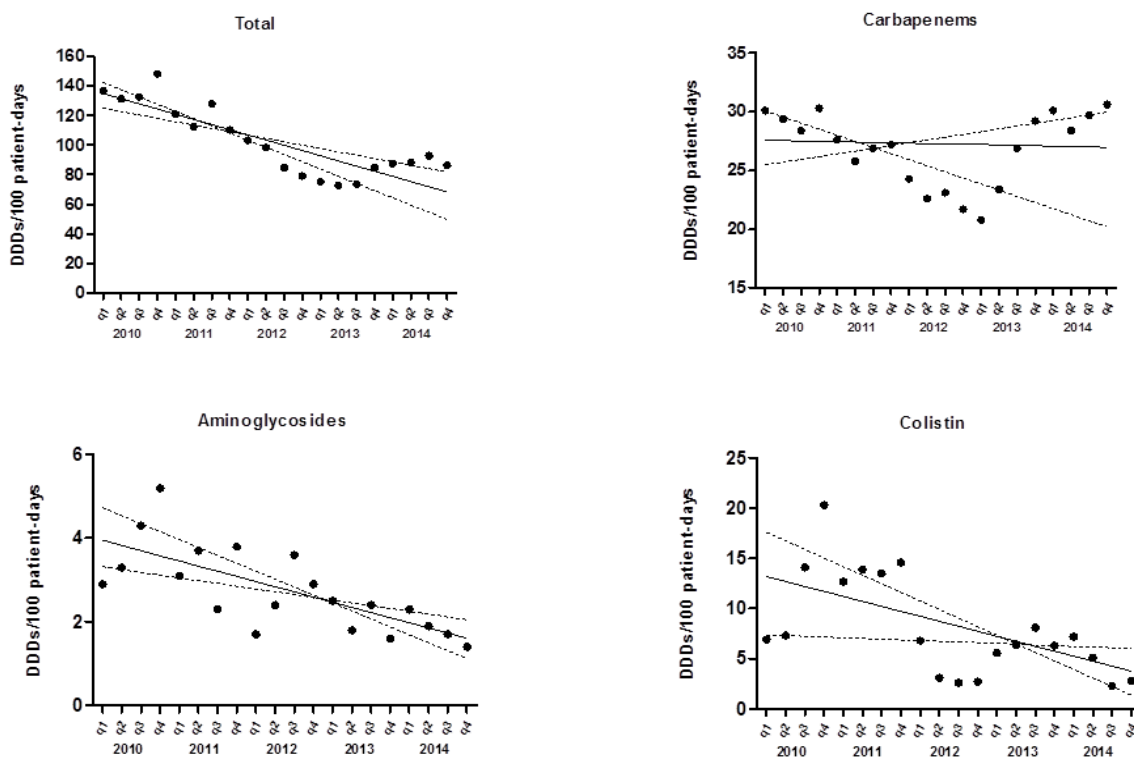
Η επίπτωση των CP-Kp βακτηριαμιών μεταξύ 2010-2014. Συμπαγείς κουκκίδες: τρίμηνη επίπτωση CP-Kp βακτηριαμιών, κάθετη διακεκομμένη γραμμή: έναρξη παρέμβασης, συνεχείς γραμμές: προσαρμοσμένες γραμμές παλινδρόμησης για τις περιόδους προ και μετά την παρέμβαση.

Διάγραμμα 8 - Τρίμηνη επίπτωση βακτηριαμιών από όλα τα παθογόνα



Η επίπτωση όλων των βακτηριαμιών μεταξύ 2010-2014. Συμπαγείς κουκκίδες: τρίμηνη επίπτωση όλων των βακτηριαμιών, κάθετη διακεκομμένη γραμμή: έναρξη παρέμβασης, συνεχής γραμμή: προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης για την περίοδο μετά την παρέμβαση.

Διάγραμμα 9 - Τρίμηνη κατανάλωση αντιβιοτικών σε Defined Daily Doses



Τρίμηνη κατανάλωση αντιβιοτικών σε Defined Daily Doses (DDDs)/100 ασθενείς-ημέρες μεταξύ Ιανουαρίου 2010 και Δεκεμβρίου 2014. Οι τελείες αντιπροσωπεύουν τις παρατηρηθείσες τιμές κατανάλωσης, οι συνεχείς γραμμές την υπολογιζόμενη τάση μεταβολής της κατανάλωσης και οι διακεκομμένες τα 95% όρια αξιοπιστίας.

Άνω αριστερά: συνολική κατανάλωση αντιβιοτικών (p value <0.001), άνω δεξιά: κατανάλωση καρβαπενεμών (p μη σημαντικό), κάτω αριστερά: κατανάλωση αμινογλυκοσιδών (p value <0.001), κάτω δεξιά: κατανάλωση κολιστίνης (p value <0.01).

4 Συζήτηση

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι ο έγκαιρος εντοπισμός των ασυμπτωματικών CP-Kp αποικισμένων ασθενών με επακόλουθο διαχωρισμό τους από μη φορείς και σε συνδυασμό με μέτρα επαφής, προώθηση της υγιεινής των χεριών και απολύμανση του περιβάλλοντος, οδηγούν σε σημαντικό περιορισμό της διασποράς των CP-Kp και μείωση των βακτηριαμιών από τα στελέχη αυτά, σε μια Αιματολογική Κλινική όπου η επίπτωση των λοιμώξεων και η σχετιζόμενη θνησιμότητα ήταν υψηλές.

Πριν την παρέμβαση με την δέσμη μέτρων που εφαρμόστηκε, ένα σημαντικό ποσοστό της τάξης του 28.6% των νοσηλευόμενων ασθενών της Αιματολογικής Κλινικής του νοσοκομείου μας βρέθηκε αποικισμένο με CP-Kp στελέχη. Αυτό ήταν αποτέλεσμα της συνεχούς εισροής CP-Kp αποικισμένων ασθενών και της μετάδοσης από ασθενή σε ασθενή λόγω ανεπαρκών πρακτικών πρόληψης νοσοκομειακών λοιμώξεων. Πράγματι, περίπου το 10% των εισαγωγών αφορούσε σε ήδη αποικισμένους ασθενείς. Επιπλέον, μεγάλο ποσοστό των απομονωθέντων CP-Kp στελεχών που εξετάστηκαν με PFGE και ταξινομήθηκαν σε ομάδες βάσει του γενετικού τους προφίλ, χαρακτηρίστηκαν από γενετική ομοιότητα, αποδεικνύοντας οριζόντια μετάδοση. Σε νοσηλευτικά ιδρύματα με αυτά τα χαρακτηριστικά, η στρατηγική ελέγχου των λοιμώξεων θα πρέπει να στοχεύει σε δύο σημεία της διασποράς: i) στην έγκαιρη ανίχνευση των φορέων και τον φυσικό διαχωρισμό τους και ii) στη διακοπή της οριζόντιας μετάδοσης μέσω μέτρων επαφής και ενισχυμένων πρακτικών πρόληψης.

Η διασπορά των CP-Kp στελεχών από ασθενή σε ασθενή μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας αποτελεί την κύρια οδό μετάδοσης στα νοσηλευτικά

ιδρύματα [377]. Σε μία μελέτη που εφάρμοσε ένα μαθηματικό μοντέλο σε δεδομένα του νοσοκομείου μας, εκτιμήθηκε ότι η ελάχιστη συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών που απαιτείται για τον έλεγχο της διασποράς των CP-Kp ήταν περίπου 50% [19]. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε στη Κλινική της μελέτης μας, όμως είναι αμφισβητήσιμο εάν σε μονάδες με ανεπαρκές νοσηλευτικό προσωπικό είναι δυνατή η διατήρηση μίας σχετικά καλής συμμόρφωσης με την υγιεινή των χεριών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, η υγιεινή των χεριών μόνη της είχε πτωχά αποτελέσματα στη διασπορά των CP-Kp στο νοσοκομείο μας όπου υπήρχε συνεχής εισαγωγή αποικισμένων ασθενών [19]. Επομένως, σε ενδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα απαιτείται η εφαρμογή επιπρόσθετων μέτρων όπως συστήνουν επιστημονικές εταιρείες και ειδικοί [378-380].

Οι ασυμπτωματικοί CP-Kp φορείς αποτελούν σημαντική πηγή διασποράς σε άλλους ασθενείς. Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι τα κλινικά μόνο δείγματα αποτυγχάνουν να ανιχνεύσουν σημαντικό ποσοστό αποικισμένων ασθενών και μόνο η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση μπορεί να περιορίσει την επίπτωση των λοιμώξεων από τα στελέχη αυτά [381, 382]. Ομοίως, στην παρούσα μελέτη, η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση αναδείχθηκε καίριας σημασίας για διάφορους λόγους. Πρώτα, ο μηνιαίος επιπολασμός των αποικισμένων ασθενών κατά την εισαγωγή ήταν >10% πριν την παρέμβαση και κατά τη διάρκεια της έρευνας κυμαινόταν μεταξύ 0 και 11.1%. Επιπλέον, όταν εντοπιζόταν ένας CP-Kp φορέας ακολουθούσε μόνωση του ασθενούς και ενίσχυση των μέτρων επαφής. Τέλος, η επιτήρηση αποτελούσε έναν δείκτη αξιολόγησης της δέσμης μέτρων που εφαρμόστηκε. Σε νοσηλευτικά ιδρύματα με λιγοστούς πόρους, όπως και το δικό μας, η ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση μπορεί να διακοπεί όταν παρατηρείται μεγάλη

πτώση της διασποράς και να περιορίζεται στην εισαγωγή ασθενών υψηλού κινδύνου βάσει της τοπικής επιδημιολογίας.

Διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει τον περιορισμό Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες (CRE) μέσω της εφαρμογής δέσμης μέτρων [381, 383-390]. Ο σχεδιασμός των μελετών αυτών δεν επιτρέπει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεμονωμένων μέτρων. Διάφοροι ερευνητές, ωστόσο, έχουν καταδείξει ότι η έγκαιρη ανίχνευση ασυμπτωματικών φορέων που ακολουθείται από το διαχωρισμό τους και την καθιέρωση συγκεκριμένου ιατρονοσηλευτικού προσωπικού είναι καίριας σημασίας στον περιορισμό των CRE [309, 391-393]. Όμοια με τα ευρήματα αυτά, η εφαρμογή των μέτρων στην Αιματολογική Κλινική οδήγησε σύντομα στη μείωση του επιπολασμού και της επίπτωσης των αποικισμένων με CP-Kp. Πιο σημαντική υπήρξε η πτώση της επίπτωσης των βακτηριαιμιών από CP-Kp, αλλά και από όλα τα παθογόνα, που παρατηρήθηκαν. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή των μέτρων οδήγησε όχι μόνο στην αναχαίτιση της αυξανόμενης επίπτωσης των CP-Kp βακτηριαιμιών, αλλά και στην εξάλειψη των εν λόγω λοιμώξεων για διάστημα 18 μηνών, με εξαίρεση μίας περίπτωσης βακτηριαιμίας σε ασθενή που μεταφέρθηκε από άλλο νοσηλευτικό ίδρυμα

Προγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι σημαντική μερίδα των αποικισμένων ασθενών με αιματολογικές παθήσεις μπορεί να αναπτύξουν βακτηριαιμία με καταστροφικές συνέπειες [394-396]. Στην μελέτη μας, έντεκα από του 38 αποικισμένους ασθενείς (28.9%) ανέπτυξαν βακτηριαιμία και επτά από αυτούς (63.6%) απεβίωσαν εξαιτίας της λοίμωξης. Επιπρόσθετα, σε όλες τις περιπτώσεις βακτηριαιμίας, τα στελέχη των λοιμώξεων είχαν πανομοιότυπο γενετικό προφίλ με αυτά των αποικισμών. Επομένως, μετά τον αποικισμό και την εγκατάσταση στον

γαστρεντερικό σωλήνα, τα CP-Kp στελέχη μπορούν να μεταφερθούν σε άλλες ανατομικές θέσεις και να οδηγήσουν σε λοιμώξεις με σοβαρές συνέπειες για τον πάσχοντα. Άρα, αποδεικνύεται εξαιρετικής σημασίας η προστασία των ασθενών αυτών πριν τον αποικισμό τους. Σημειωτέον ότι όλα τα περιστατικά CP-Kp βακτηριαμιών αφορούσαν αποικισθέντες ασθενείς και ουδείς εκ των μη αποικισθέντων εκδήλωσε CP-Kp λοίμωξη. Συνεπώς, εάν περιορισθεί ο αριθμός των φορέων δύναται να ελαττωθεί και ο αριθμός των λοιμώξεων. Πράγματι, η εφαρμοσθείσα δέσμη μέτρων οδήγησε στην ελάττωση της διασποράς των CP-Kp από ασθενή σε ασθενή και στη συνέχεια στη σημαντική ελάττωση του ποσοστού των αποικισθέντων ασθενών, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα τη θεαματική μείωση έως και εξάλειψη των βακτηριαμιών.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι είναι δύσκολο έως ανέφικτο να επιτευχθεί συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών σε υψηλά επίπεδα και για μεγάλο χρονικό διάστημα, ειδικότερα σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας με ελλείψεις στο νοσηλευτικό προσωπικό [346]. Ο εντοπισμός όμως και η επισήμανση των CP-Kp φορέων δρα σαν καταλύτης και ακολουθεί μία σειρά ενεργειών που ενισχύουν τα μέτρα ελέγχου. Πρώτον, με την επισήμανση ότι υπάρχει CP-Kp φορέας, ευαισθητοποιείται το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό, και αυξάνεται η συμμόρφωση στην υγιεινή των χεριών για τους συγκεκριμένους ασθενείς. Δεύτερον, μόνο μετά την ανεύρεση CP-Kp φορείας απομονώνεται ο ασθενής και εφαρμόζονται τα μέτρα επαφής. Συνεπώς, κάθε ένα από τη δέσμη μέτρων που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη δεν λειτούργησε ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα αλλά σαν σύνολο, με αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Τον κεντρικό ρόλο όμως φαίνεται ότι διαδραμάτισε η ανεύρεση των ασθενών με CP-Kp φορεία ή λοίμωξη.

Στην εφαρμοσθείσα δέσμη μέτρων τον Ιούνιο του 2011 δεν περιελήφθησαν επιπλέον μέτρα για τον περιορισμό χρήσης των αντιβιοτικών εκτός από αυτά που ίσχυαν από τον Ιανουάριο του 2010. Μετά την εφαρμογή του προγράμματος περιορισμού χρήσης των αντιβιοτικών (Ιανουάριος του 2010), είχε αρχίσει να παρατηρείται ελάττωση της συνολικής κατανάλωσης των αντιβιοτικών, αλλά και των επιμέρους ομάδων, όπως καρβαπενεμών, κολιστίνης και αμινογλυκοσιδών. Επομένως, είναι πιθανόν η μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών, μέσω του φαινομένου της πίεσης επιλογής, να ήταν ένας επιπλέον παράγοντας που συνετέλεσε στην πτωτική πορεία των CP-Kp βακτηριαμιών.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας κατέδειξε ότι μία δέσμη μέτρων που περιλαμβάνει την ενεργό μικροβιολογική επιτήρηση κατά την εισαγωγή των ασθενών μπορεί να περιορίσει στο μέγιστο βαθμό τον αποικισμό και τις λοιμώξεις από CP-Kp στελέχη σε ενδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον αντίκτυπο των λοιμώξεων αυτών στην επιβίωση των ασθενών, ένα πολύπλευρο πρόγραμμα πρόληψης και ελέγχου θα πρέπει να εφαρμόζεται σε όλα τα κέντρα παροχής υπηρεσιών υγείας. Όταν όμως η ευρεία παρέμβαση δεν είναι δυνατή λόγω ανεπαρκών πόρων, τίθεται η ανάγκη εφαρμογής στοχευμένων πρακτικών σε μονάδες υψηλού κινδύνου με στόχο την προστασία των περισσότερο ευάλωτων ασθενών.

Περίληψη

Σκοπός. Στελέχη *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες έχουν εξελιχθεί σε σημαντικό παθογόνο στα περισσότερα τεταρτοβάθμια νοσοκομεία της Ελλάδας. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα δέσμης μέτρων στον περιορισμό των CP-Kp σε Αιματολογική Κλινική, όπου η επίπτωση λοιμώξεων από τέτοια στελέχη ήταν υψηλή.

Υλικό – Μέθοδος. Η μελέτη διεξήχθη μεταξύ Ιουνίου 2011 και Δεκεμβρίου 2014 σε Αιματολογική Κλινική τεταρτοβάθμιου νοσοκομείου με δύναμη 500 κλινών στην περιοχή της Αθήνας. Μία δέσμη μέτρων (ενεργός μικροβιολογική επιτήρηση, διαχωρισμός φορέων, αποκλειστικός νοσηλευτής για τους φορείς, μέτρα επαφής, απολύμανση του περιβάλλοντος και προώθηση της υγιεινής των χεριών) εκτιμήθηκε για τον περιορισμό του αποικισμού και των λοιμώξεων από CP-Kp στελέχη.

Αποτελέσματα. Συνολικά ελήφθησαν 2.507 δείγματα φορείας, 1.199 κατά την εισαγωγή μεταξύ Ιουνίου 2011 και Ιουνίου 2013 και 1.307 κατά τη νοσηλεία των ασθενών από τον Ιούνιο του 2011 έως το Δεκέμβριο του 2012. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης, ο αποικισμός με CP-Kp στελέχη κατά την εισαγωγή ($p < 0.001$), ο αποικισμός κατά τη νοσηλεία ($p = 0.001$) και η επίπτωση του αποικισμού ($p = 0.072$) παρουσίασαν μείωση. Η εφαρμογή τμηματικής γραμμικής παλινδρόμησης ανέδειξε μεταβολή στο επίπεδο και την διαφορά της επίπτωσης των βακτηριαιμιών από CP-Kp στελέχη μεταξύ των περιόδων πριν και μετά την εφαρμογή των μέτρων σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p = 0.001$ και $p < 0.001$) αντίστοιχα.

Συμπεράσματα. Η εφαρμογή δέσμης μέτρων συμπεριλαμβανομένης της ενεργούς μικροβιολογικής επιτήρησης κατά την εισαγωγή μπορεί να περιορίσει τον αποικισμό και τις λοιμώξεις από CP-Kp στελέχη σε ενδημικά νοσηλευτικά ιδρύματα.

Summary

Background: Carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (CP-Kp) has been established as important nosocomial pathogen in most tertiary care hospitals in Greece. The aim of the present study was to examine the impact of an enhanced infection control program on the containment of CP-Kp in a hematology unit where the incidence of CP-Kp infections was high.

Methods: The study was conducted from June 2011 to December 2014 in a hematology unit of a tertiary-care 500-bed hospital located in Athens, Greece. A bundled intervention (active surveillance cultures, separation of carriers from non-carriers, assignment of dedicated nursing staff, contact precautions, environmental cleaning, and promotion of hand hygiene) was tested whether would reduce colonization and infection caused by CP-Kp.

Results: A total of 2507 rectal swabs were obtained; 1199 upon admission from June 2011 to June 2013 and 1307 during hospitalization from June 2011 to December 2012. During intervention the admission prevalence of CP-Kp colonization ($p < 0.001$ for linear trend), the hospitalization prevalence ($p = 0.001$ for linear trend) and the incidence rate of CP-Kp colonization ($p = 0.072$ for linear trend) were declining. Application of segmented linear regression revealed that both the change in the level of CP-Kp BSI incidence rates ($p = 0.001$) as well as the difference between pre- and post-intervention slopes were statistically significant ($p < 0.001$).

Conclusions. A bundled intervention including active surveillance cultures on admission can attain maximum containment of CP-Kp colonization and infection in endemic acute healthcare settings.

Βιβλιογραφία

1. Carmeli, Y., et al., *Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(2): p. 102-11.
2. Grundmann, H., et al., *Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts*. Euro Surveill, 2010. **15**(46).
3. Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas, *The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(4): p. 228-36.
4. Schwaber, M.J. and Y. Carmeli, *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat*. JAMA, 2008. **300**(24): p. 2911-3.
5. Wernli, D., et al., *A call for action: the application of The International Health Regulations to the global threat of antimicrobial resistance*. PLoS Med, 2011. **8**(4): p. e1001022.
6. Queenan, A.M. and K. Bush, *Carbapenemases: the versatile beta-lactamases*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(3): p. 440-58, table of contents.
7. Ben-David, D., et al., *Outcome of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae bloodstream infections*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(1): p. 54-60.
8. Bratu, S., et al., *Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium*. Arch Intern Med, 2005. **165**(12): p. 1430-5.
9. Daikos, G.L., 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**(5): p. 1868-73.
10. Patel, G., et al., *Outcomes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(12): p. 1099-106.
11. Schwaber, M.J., et al., *Predictors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(3): p. 1028-33.
12. Munoz-Price, L.S., et al., *Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(9): p. 785-96.
13. Casewell, M. and I. Phillips, *Hands as route of transmission for Klebsiella species*. Br Med J, 1977. **2**(6098): p. 1315-7.
14. Tacconelli, E., et al., *ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20 Suppl 1**: p. 1-55.
15. Centers for Disease, C. and Prevention, *Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. **58**(10): p. 256-60.
16. Weinstein, R.A., *Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 188-92.
17. Austin, D.J., et al., *Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6908-13.
18. Grundmann, H., et al., *Risk factors for the transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an adult intensive care unit: fitting a model to the data*. J Infect Dis, 2002. **185**(4): p. 481-8.

19. Sypsa, V., et al., *Transmission dynamics of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae and anticipated impact of infection control strategies in a surgical unit*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41068.
20. Armand-Lefevre, L., et al., *Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(3): p. 1488-95.
21. Daikos, G.L., et al., *Risk factors for bloodstream infection with Klebsiella pneumoniae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(4): p. 784-8.
22. Falagas, M.E., et al., *Risk factors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections: a matched case control study*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(5): p. 1124-30.
23. Gagliotti, C., et al., *Risk factors for colonization with carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in hospital: a matched case-control study*. Am J Infect Control, 2014. **42**(9): p. 1006-8.
24. Gasink, L.B., et al., *Risk factors and clinical impact of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(12): p. 1180-5.
25. Lin, M.Y., et al., *The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(9): p. 1246-52.
26. Papadimitriou-Olivgeris, M., et al., *Risk factors for KPC-producing Klebsiella pneumoniae enteric colonization upon ICU admission*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(12): p. 2976-81.
27. Chong, Y., et al., *Cefepime-resistant Gram-negative bacteremia in febrile neutropenic patients with hematological malignancies*. Int J Infect Dis, 2010. **14 Suppl 3**: p. e171-5.
28. Kolar, M., et al., *Prevalence and spread of pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae strains in patients with hematological malignancies*. New Microbiol, 2009. **32**(1): p. 67-76.
29. Kolhatkar, J.O.O.A.A., *Medical laboratory science : theory and practice*. Vol. Chapter 14. 2000.
30. Brenner, D.J., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. ed, ed. W. Wilkins). July 26, 2005, New York: Springer.
31. Mahon, C.R. and G. Manuselis, *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2000: Saunders.
32. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 2002: Mosby.
33. Iredell, J., J. Brown, and K. Tagg, *Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications*. BMJ, 2016. **352**: p. h6420.
34. Paterson, D.L., *Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae*. Am J Med, 2006. **119**(6 Suppl 1): p. S20-8; discussion S62-70.
35. D, E.B.a.Z., *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 5th edition ed. 2000: Churchill Livingstone/Elsevier.
36. A., A., *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων*, ed. Τ. έκδοση. Vol. Τόμος 1. 1994, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα.
37. S., B., *"Medical Microbiology"*. 4th ed ed. 1996, Texas.
38. E.A., Γ., *«Ιατρική Ανοσολογία»*. 2000, Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση
39. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 217-25.
40. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.

41. Murray PR, *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ed. Vol. vol. 1. 2003 Baron EJ, Jorgensen JH et al. .
42. DuPont, H.L., et al., *Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea*. N Engl J Med, 1971. **285**(1): p. 1-9.
43. Karmali, M.A., *Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2**(1): p. 15-38.
44. Wells, J.G., et al., *Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype*. J Clin Microbiol, 1983. **18**(3): p. 512-20.
45. Crosa, J.H., et al., *Molecular relationships among the Salmonelleae*. J Bacteriol, 1973. **115**(1): p. 307-15.
46. Hickman, F.W. and J.J. Farmer, 3rd, *Salmonella typhi: identification, antibiograms, serology, and bacteriophage typing*. Am J Med Technol, 1978. **44**(12): p. 1149-59.
47. WH., E., *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Vol. 4th ed. 1986, New York.: Elsevier Science Publishing Co.
48. Kandolo, K. and G. Wauters, *Pyrazinamidase activity in Yersinia enterocolitica and related organisms*. J Clin Microbiol, 1985. **21**(6): p. 980-2.
49. Wadstrom, T., et al., *Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease*. Arch Dis Child, 1976. **51**(11): p. 865-70.
50. Schaberg, D.R., D.H. Culver, and R.P. Gaynes, *Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection*. Am J Med, 1991. **91**(3B): p. 72S-75S.
51. Greenwood David, E.A.T., *Ιατρική μικροβιολογία Μικροβιακές λοιμώξεις: Παθογένεια, ανοσία, εργαστηριακή διάγνωση και θεραπεία*. Vol. Τόμος 1. 2010: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
52. Dworkin, M., et al., *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*. Vol. 6. 2006: Springer New York.
53. Hormaeche, E., and P. R. Edwards. , *A proposal genus Enterobacter*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 1960. **10:71–74**.
54. Hormaeche, E., and P. R. Edwards. , *Observations on the genus Aerobacter with a description of two species*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 1958. **8:111–115**.
55. Bergey, D.H., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. . Williams and Wilkins, 1923.
56. Lautrop, H., *Gelatin liquefying Klebsiella strains (B.oxytoca)*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 1956. **39:375–384**.
57. Izard, D., C. Ferragut, F. Gavini, K. Kersters, J. De Ley, and and H. Leclerc, *Klebsiella terrigena, a new species from soil and water*. . Int. J. System. Bacteriol, 1981. **31:116–127**.
58. Bagley, S.T., R.J. Seidler, and D.J. Brenner, *Klebsiella planticola sp. nov.: A new species of enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments*. Current Microbiology, 1981. **6**(2): p. 105-109.
59. Ryan KJ, R.C.S.M.M.M.H.t.e.
60. Paczosa, M.K. and J. Meccas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. Microbiol Mol Biol Rev, 2016. **80**(3): p. 629-61.
61. Niemela, S.I. and P. Vaatanen, *Survival in lake water of Klebsiella pneumoniae discharged by a paper mill*. Appl Environ Microbiol, 1982. **44**(2): p. 264-9.
62. Sjogren, R.E. and M.J. Gibson, *Bacterial survival in a dilute environment*. Appl Environ Microbiol, 1981. **41**(6): p. 1331-6.
63. Caplenas, N.R., M.S. Kanarek, and A.P. Dufour, *Source and extent of Klebsiella pneumoniae in the paper industry*. Appl Environ Microbiol, 1981. **42**(5): p. 779-85.

64. Brown, C. and R.J. Seidler, *Potential pathogens in the environment: Klebsiella pneumoniae, a taxonomic and ecological enigma*. Appl Microbiol, 1973. **25**(6): p. 900-4.
65. Duncan, D.W. and W.E. Razzell, *Klebsiella biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce*. Appl Microbiol, 1972. **24**(6): p. 933-8.
66. Niemela, S.I., et al., *Microbial incidence in upper respiratory tracts of workers in the paper industry*. Appl Environ Microbiol, 1985. **50**(1): p. 163-8.
67. Gordon, D.M. and F. FitzGibbon, *The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects*. Microbiology, 1999. **145 (Pt 10)**: p. 2663-71.
68. Dillon, R.J., C.T. Vennard, and A.K. Charnley, *A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone*. J Appl Microbiol, 2002. **92**(4): p. 759-63.
69. Braman, S.K., et al., *Capsular types of Klebsiella pneumoniae associated with bovine mastitis*. J Am Vet Med Assoc, 1973. **162**(2): p. 109-11.
70. Podschun, R. and U. Ullmann, *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4): p. 589-603.
71. Davis, T.J. and J.M. Matsen, *Prevalence and characteristics of Klebsiella species: relation to association with a hospital environment*. J Infect Dis, 1974. **130**(4): p. 402-405.
72. Casewell, M. and H.G. Talsania, *Predominance of certain klebsiella capsular types in hospitals in the United Kingdom*. Journal of Infection, 1979. **1**(1): p. 77-79.
73. Cooke, E.M., et al., *An investigation into the incidence and sources of klebsiella infections in hospital patients*. The Journal of Hygiene, 1979. **82**(3): p. 473-480.
74. Carpenter, J.L., *Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(4): p. 672-82.
75. Eickhoff, T.C., B.W. Steinhauer, and M. Finland, *The Klebsiella-Enterobacter-Serratia division. Biochemical and serologic characteristics and susceptibility to antibiotics*. Ann Intern Med, 1966. **65**(6): p. 1163-79.
76. Vergis, E.N., et al., *Azithromycin vs cefuroxime plus erythromycin for empirical treatment of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a prospective, randomized, multicenter trial*. Arch Intern Med, 2000. **160**(9): p. 1294-300.
77. Feldman, C., et al., *Klebsiella pneumoniae bacteraemia at an urban general hospital*. J Infect, 1990. **20**(1): p. 21-31.
78. Hansen, D.S., A. Gottschau, and H.J. Kolmos, *Epidemiology of Klebsiella bacteraemia: a case control study using Escherichia coli bacteraemia as control*. J Hosp Infect, 1998. **38**(2): p. 119-32.
79. Bauernfeind, A., C. Petermuller, and R. Schneider, *Bacteriocins as tools in analysis of nosocomial Klebsiella pneumoniae infections*. J Clin Microbiol, 1981. **14**(1): p. 15-9.
80. Garcia de la Torre, M., et al., *Klebsiella bacteremia: an analysis of 100 episodes*. Rev Infect Dis, 1985. **7**(2): p. 143-50.
81. Monnet, D., et al., *Difficulties in identifying Klebsiella strains of clinical origin*. Zentralbl Bakteriell, 1991. **274**(4): p. 456-64.
82. Hart, C.A. and S.K. Rao, *Rhinoscleroma*. J Med Microbiol, 2000. **49**(5): p. 395-6.
83. Chand, M.S. and C.J. MacArthur, *Primary atrophic rhinitis: a summary of four cases and review of the literature*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1997. **116**(4): p. 554-8.
84. Hart, C.A., *Klebsiellae and neonates*. J Hosp Infect, 1993. **23**(2): p. 83-6.
85. Gassama, A., et al., *Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus*. Int J Infect Dis, 2001. **5**(4): p. 192-8.

86. Nguyen Thi, P.L., et al., *Enteropathogenic Klebsiella pneumoniae HIV-infected adults, Africa*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(1): p. 135-7.
87. Beveridge, T.J., *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4725-33.
88. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(5): p. a000414.
89. Kabha, K., et al., *Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 847-52.
90. Moxon, E.R. and J.S. Kroll, *The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **150**: p. 65-85.
91. Nikaido, H., *Structure and functions of the cell envelope of gram-negative bacteria*. Rev Infect Dis, 1988. **10 Suppl 2**: p. S279-81.
92. Orskov, I., *O antigens in the Klebsiella group*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1954. **34**(2): p. 145-56.
93. Ørskov, I., and F. Ørskov, *Serotyping of Klebsiella*. Methods Microbiol. 14:143-164., 1984.
94. Brisse, S., S. Issenhuth-Jeanjean, and P.A. Grimont, *Molecular serotyping of Klebsiella species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3388-98.
95. Paganin, F., et al., *Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor*. Eur Respir J, 2004. **24**(5): p. 779-85.
96. Jarvis, W.R., et al., *The epidemiology of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae*. Infect Control, 1985. **6**(2): p. 68-74.
97. Daikos, G.L., et al., *Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: a clinical perspective*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(12): p. 1393-404.
98. Prokesch, B.C., et al., *Primary osteomyelitis caused by hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(9): p. e190-e195.
99. Shon, A.S., R.P. Bajwa, and T.A. Russo, *Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: a new and dangerous breed*. Virulence, 2013. **4**(2): p. 107-18.
100. Cheng, D.L., et al., *Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with Klebsiella pneumoniae bacteremia in diabetic patients*. Arch Intern Med, 1991. **151**(8): p. 1557-9.
101. Russo, T.A. and C.M. Marr, *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev, 2019. **32**(3).
102. Shehata, M.A., *Atrophic rhinitis*. Am J Otolaryngol, 1996. **17**(2): p. 81-6.
103. Monnet, D. and J. Freney, *Method for differentiating Klebsiella planticola and Klebsiella terrigena from other Klebsiella species*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(4): p. 1121-2.
104. Sekowska, A., *Raoultella spp.-clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics*. Folia Microbiol (Praha), 2017.
105. Seng, P., et al., *Emerging role of Raoultella ornithinolytica in human infections: a series of cases and review of the literature*. Int J Infect Dis, 2016. **45**: p. 65-71.
106. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(2): p. 136-69.
107. Williams, P.a.T., J. M. . 1990, *The pathogenicity of Klebsiella pneumoniae* Rev Med Microbiol. **1**: p. 196 – 204.
108. Podschun, R. and H. Sahly, *Hemagglutinins of Klebsiella pneumoniae and K. oxytoca isolated from different sources*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1991. **191**(1): p. 46-52.
109. Przondo Hessek, A. and G. Pulverer, *Hemagglutinins of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca*. Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A, 1983. **255**(4): p. 472-8.

110. Fader, R.C. and C.P. Davis, *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. *J Urol*, 1982. **128**(1): p. 197-201.
111. Clegg, S. and G.F. Gerlach, *Enterobacterial fimbriae*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(3): p. 934-8.
112. Tarkkanen, A.M., et al., *Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles*. *Mol Microbiol*, 1990. **4**(8): p. 1353-61.
113. Wurker, M., et al., *Type of fimbriation determines adherence of Klebsiella bacteria to human epithelial cells*. *Zentralbl Bakteriologie*, 1990. **274**(2): p. 239-45.
114. Hornick, D.B., et al., *Adherence to respiratory epithelia by recombinant Escherichia coli expressing Klebsiella pneumoniae type 3 fimbrial gene products*. *Infect Immun*, 1992. **60**(4): p. 1577-88.
115. Di Martino, P., et al., *Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces*. *Res Microbiol*, 2003. **154**(1): p. 9-16.
116. Langstraat, J., M. Bohse, and S. Clegg, *Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of Klebsiella pneumoniae, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation*. *Infect Immun*, 2001. **69**(9): p. 5805-12.
117. Williams, P., et al., *The role of the O and K antigens in determining the resistance of Klebsiella aerogenes to serum killing and phagocytosis*. *J Gen Microbiol*, 1983. **129**(7): p. 2181-91.
118. Podschun, R. and U. Ullmann, *Klebsiella capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum*. *J Med Microbiol*, 1992. **36**(4): p. 250-4.
119. Podschun, R., I. Penner, and U. Ullmann, *Interaction of Klebsiella capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes*. *Microb Pathog*, 1992. **13**(5): p. 371-9.
120. Mizuta, K., et al., *Virulence for mice of Klebsiella strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types*. *Infect Immun*, 1983. **40**(1): p. 56-61.
121. Ofek, I., et al., *Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between Klebsiella pneumoniae strains expressing serotypes K2 and K21a*. *Infect Immun*, 1993. **61**(10): p. 4208-16.
122. Podschun, R., et al., *Comparative investigations of Klebsiella species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes*. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg A*, 1986. **262**(3): p. 335-45.
123. Cryz, S.J., Jr., et al., *Seroepidemiology of Klebsiella bacteremic isolates and implications for vaccine development*. *J Clin Microbiol*, 1986. **23**(4): p. 687-90.
124. Simoons-Smit, A.M., et al., *Biochemical and serological investigations on clinical isolates of klebsiella*. *J Hyg (Lond)*, 1985. **95**(2): p. 265-76.
125. Ullmann, U., *The distribution of Klebsiella pneumoniae serotypes from different sources and their sensitivity to cephalosporins*. *Infection*, 1983. **11 Suppl 1**: p. S28-31.
126. Riser, E. and P. Noone, *Klebsiella capsular type versus site of isolation*. *J Clin Pathol*, 1981. **34**(5): p. 552-5.
127. Hansen, D.S., et al., *Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(1): p. 56-62.
128. Merino, S., et al., *Mechanisms of Klebsiella pneumoniae resistance to complement-mediated killing*. *Infect Immun*, 1992. **60**(6): p. 2529-35.
129. Merle, N.S., et al., *Complement System Part II: Role in Immunity*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 257.
130. Shankar-Sinha, S., et al., *The Klebsiella pneumoniae O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia*. *Infect Immun*, 2004. **72**(3): p. 1423-30.

131. Alberti, S., et al., *Analysis of complement C3 deposition and degradation on Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4726-32.
132. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiol Mol Biol Rev, 2007. **71**(3): p. 413-51.
133. Brisse, S. and J. Verhoef, *Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 3): p. 915-24.
134. Drancourt, M., et al., *Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoultella gen. nov., with description of Raoultella ornithinolytica comb. nov., Raoultella terrigena comb. nov. and Raoultella planticola comb. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 3): p. 925-32.
135. Brisse, S., et al., *Development of a rapid identification method for Klebsiella pneumoniae phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(10): p. 942-5.
136. Jonas, D., et al., *Discrimination of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca phylogenetic groups and other Klebsiella species by use of amplified fragment length polymorphism*. Res Microbiol, 2004. **155**(1): p. 17-23.
137. Rennie, R.P. and I.B. Duncan, *Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of Klebsiella*. Appl Microbiol, 1974. **28**(4): p. 534-9.
138. Hansen, D.S., et al., *Klebsiella typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(7): p. 397-404.
139. Ørskov, I.a.K.T.I.N.R.K., a.J.G.H.B.s.M.o.S. Bacteriology., and M. Williams and Wilkins. Baltimore.
140. Riley, M.A. and J.E. Wertz, *Bacteriocins: evolution, ecology, and application*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 117-37.
141. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3140-5.
142. Cheng, H.P., et al., *Klebsiella pneumoniae liver abscess in Taiwan is not caused by a clonal spread strain*. J Microbiol Immunol Infect, 2002. **35**(2): p. 85-8.
143. Lebessi, E., et al., *Extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit in the high-prevalence area of Athens, Greece*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 799-804.
144. Poh, C.L., S.C. Yap, and M. Yeo, *Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of Klebsiella pneumoniae*. J Hosp Infect, 1993. **24**(2): p. 123-8.
145. Rodrigues, C., et al., *Identification of Klebsiella pneumoniae, Klebsiella quasipneumoniae, Klebsiella variicola and Related Phylogroups by MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 3000.
146. Dinkelacker, A.G., et al., *Typing and Species Identification of Clinical Klebsiella Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. J Clin Microbiol, 2018. **56**(11).
147. Kumar, V., et al., *Comparative genomics of Klebsiella pneumoniae strains with different antibiotic resistance profiles*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(9): p. 4267-76.
148. Zhao, F., et al., *Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in Klebsiella pneumoniae*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10141.
149. Wu, K.M., et al., *Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis*. J Bacteriol, 2009. **191**(14): p. 4492-501.

150. Lai, Y.C., et al., *Identification of genes present specifically in a virulent strain of Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 7149-51.
151. Fouts, D.E., et al., *Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte Klebsiella pneumoniae 342 and virulence predictions verified in mice*. PLoS Genet, 2008. **4**(7): p. e1000141.
152. McClelland, M., et al., *Comparison of the Escherichia coli K-12 genome with sampled genomes of a Klebsiella pneumoniae and three salmonella enterica serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(24): p. 4974-86.
153. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.
154. Chaves, J., et al., *SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(10): p. 2856-61.
155. Haeggman, S., S. Lofdahl, and L.G. Burman, *An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for Klebsiella pneumoniae, is the ancestor of SHV-1*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(12): p. 2705-9.
156. Arakawa, Y., et al., *Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded beta-lactamase gene of Klebsiella pneumoniae and the TEM beta-lactamase gene mediated by R plasmids*. FEBS Lett, 1986. **207**(1): p. 69-74.
157. Paterson, D.L., et al., *Extended-spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(11): p. 3554-60.
158. Gutmann, L., et al., *SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams*. Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(6): p. 951-6.
159. Kliebe, C., et al., *Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins*. Antimicrob Agents Chemother, 1985. **28**(2): p. 302-7.
160. Barthelemy, M., et al., *Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme*. FEBS Lett, 1988. **231**(1): p. 217-20.
161. Knothe, H., et al., *Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofuran, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens*. Infection, 1983. **11**(6): p. 315-7.
162. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(10): p. 1791-8.
163. Patel, G. and R.A. Bonomo, *Status report on carbapenemases: challenges and prospects*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. **9**(5): p. 555-70.
164. Walsh, T.R., *Emerging carbapenemases: a global perspective*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36 Suppl 3**: p. S8-14.
165. Sarno, R., et al., *Complete nucleotide sequence of Klebsiella pneumoniae multiresistance plasmid pJHCMW1*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3422-7.
166. Paterson, D.L., *Extended-spectrum beta-lactamases: the European experience*. Curr Opin Infect Dis, 2001. **14**(6): p. 697-701.
167. Fernandez-Rodriguez, A., et al., *Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(11): p. 2536-8.
168. Paterson, D.L., et al., *Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia*. Clin Infect Dis, 2000. **30**(3): p. 473-8.

169. Brisse, S., et al., *Epidemiology of quinolone resistance of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca in Europe*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(1): p. 64-8.
170. Brisse, S., et al., *Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, and Enterobacter aerogenes clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(8): p. 2051-5.
171. Deguchi, T., et al., *Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(3): p. 699-701.
172. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G.A. Jacoby, *Quinolone resistance from a transferable plasmid*. Lancet, 1998. **351**(9105): p. 797-9.
173. Datta, N. and P. Kontomichalou, *Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae*. Nature, 1965. **208**(5007): p. 239-41.
174. Bush, K. and G.A. Jacoby, *Updated functional classification of beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 969-76.
175. Hall, B.G. and M. Barlow, *Revised Ambler classification of {beta}-lactamases*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(6): p. 1050-1.
176. Ambler, R.P., *The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **289**(1036): p. 321-31.
177. Jaurin, B. and T. Grundstrom, *ampC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 4897-901.
178. Ouellette, M., L. Bissonnette, and P.H. Roy, *Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7378-82.
179. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 www.ecdc.europa.eu
180. Nordmann, P., et al., *Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from Enterobacter cloacae and cloning of the gene into Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(5): p. 939-46.
181. Yang, Y.J., P.J. Wu, and D.M. Livermore, *Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two Serratia marcescens isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(5): p. 755-8.
182. Ambler, R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*. Biochem J, 1991. **276 (Pt 1)**: p. 269-70.
183. Naas, T., et al., *Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from Serratia marcescens S6*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(6): p. 1262-70.
184. Queenan, A.M., et al., *SME-3, a novel member of the Serratia marcescens SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3485-7.
185. Gales, A.C., et al., *Carbapenem-resistant Serratia marcescens isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001. **39**(2): p. 125-7.
186. Queenan, A.M., et al., *SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse Serratia marcescens strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(11): p. 3035-9.
187. Troillet, N., et al., *Epidemiological analysis of imipenem-resistant Serratia marcescens in hospitalized patients*. J Hosp Infect, 1999. **42**(1): p. 37-43.
188. Radice, M., et al., *First class A carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(3): p. 1068-9.

189. Pottumarthy, S., et al., *NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in Enterobacter cloacae in North America*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(8): p. 999-1002.
190. Rasmussen, B.A., et al., *Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(9): p. 2080-6.
191. Mariotte-Boyer, S., M.H. Nicolas-Chanoine, and R. Labia, *A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **143**(1): p. 29-33.
192. Bratu, S., et al., *Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(2): p. 776-8.
193. Hossain, A., et al., *Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an Enterobacter sp.* Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(11): p. 4438-40.
194. Miriagou, V., et al., *Imipenem resistance in a Salmonella clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(4): p. 1297-300.
195. Yigit, H., et al., *Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1151-61.
196. Yigit, H., et al., *Carbapenem-resistant strain of Klebsiella oxytoca harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3881-9.
197. Smith Moland, E., et al., *Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(3): p. 711-4.
198. Woodford, N., et al., *Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4793-9.
199. Villegas, M.V., et al., *First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1553-5.
200. Giakkoupi, P., et al., *IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an Enterobacter cloacae clinical strain*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(9): p. 2247-53.
201. Poirel, L., et al., *Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 622-32.
202. Poirel, L., et al., *GES-2, a class A beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa with increased hydrolysis of imipenem*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(9): p. 2598-603.
203. Ryoo, N.H., et al., *Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and emergence of GES-3 in Korea*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(4): p. 698-702.
204. Pasteran, F., et al., *Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in Argentina*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(1): p. 474-5.
205. Castanheira, M., et al., *Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a Pseudomonas aeruginosa strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(6): p. 2344-5.

206. Correia, M., et al., *Molecular characterization of a new class 3 integron in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2838-43.
207. Duarte, A., et al., *Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae in a university hospital in Lisbon, Portugal*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(4): p. 1481-2.
208. Poirel, L., et al., *A nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(3): p. 561-5.
209. Jeong, S.H., et al., *First outbreak of Klebsiella pneumoniae clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4809-10.
210. Crowder, M.W., J. Spencer, and A.J. Vila, *Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria*. Acc Chem Res, 2006. **39**(10): p. 721-8.
211. Saavedra, M.J., et al., *Sfh-I, a subclass B2 metallo-beta-lactamase from a Serratia fonticola environmental isolate*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(7): p. 2330-3.
212. Walsh, T.R., et al., *Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-beta-lactamase from Aeromonas sobria 163a*. J Antimicrob Chemother, 1996. **37**(3): p. 423-31.
213. Massidda, O., G.M. Rossolini, and G. Satta, *The Aeromonas hydrophila cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases*. J Bacteriol, 1991. **173**(15): p. 4611-7.
214. Walsh, T.R., et al., *Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from Xanthomonas maltophilia*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1218**(2): p. 199-201.
215. Watanabe, M., et al., *Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(1): p. 147-51.
216. Senda, K., et al., *PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(12): p. 2909-13.
217. Riccio, M.L., et al., *Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(5): p. 1229-35.
218. Lauretti, L., et al., *Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(7): p. 1584-90.
219. Poirel, L., 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**(4): p. 891-7.
220. Daikos, G.L., et al., *VIM-1-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: analysis of 28 cases*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(4): p. 471-3.
221. Vourli, S., et al., *Emergence of Proteus mirabilis carrying the bla metallo-beta-lactamase gene*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(7): p. 691-4.
222. Galani, I., et al., *Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIC in an Enterobacter cloacae clinical isolate from Greece*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(5): p. 634-8.
223. Yong, D., et al., *Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 5046-54.

224. Nordmann, P., et al., *The emerging NDM carbapenemases*. Trends Microbiol, 2011. **19**(12): p. 588-95.
225. Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann, *Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 249856.
226. Moellering, R.C., Jr., *NDM-1--a cause for worldwide concern*. N Engl J Med, 2010. **363**(25): p. 2377-9.
227. Guducuoglu, H., et al., *Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and OXA-48-Producing Klebsiella pneumoniae: High Mortality from Pandrug Resistance*. Microb Drug Resist, 2018. **24**(7): p. 966-972.
228. Medeiros, A.A., *Beta-lactamases*. Br Med Bull, 1984. **40**(1): p. 18-27.
229. Simpson, I.N., P.B. Harper, and C.H. O'Callaghan, *Principal beta-lactamases responsible for resistance to beta-lactam antibiotics in urinary tract infections*. Antimicrob Agents Chemother, 1980. **17**(6): p. 929-36.
230. Matthew, M., *Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution*. J Antimicrob Chemother, 1979. **5**(4): p. 349-58.
231. Naas, T. and P. Nordmann, *OXA-type beta-lactamases*. Curr Pharm Des, 1999. **5**(11): p. 865-79.
232. Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros, *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(6): p. 1211-33.
233. Paton, R., et al., *ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents, 1993. **2**(2): p. 81-7.
234. Scaife, W., et al., *Transferable imipenem-resistance in Acinetobacter species from a clinical source*. J Antimicrob Chemother, 1995. **36**(3): p. 585-6.
235. Naas, T., et al., *Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4826-9.
236. Turton, J.F., et al., *Detection and typing of integrons in epidemic strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3074-82.
237. Jeon, B.C., et al., *Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2241-5.
238. Dalla-Costa, L.M., et al., *Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3403-6.
239. Da Silva, G.J., et al., *Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii clone in the Iberian Peninsula*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(1): p. 255-8.
240. Lopez-Otsoa, F., et al., *Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among Acinetobacter baumannii isolates from a hospital in northern Spain*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): p. 4741-3.
241. Bou, G., A. Oliver, and J. Martinez-Beltran, *OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an Acinetobacter baumannii clinical strain*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1556-61.
242. Lolans, K., et al., *Multicity outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing the carbapenemase OXA-40*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 2941-5.
243. Coelho, J., et al., *Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in Acinetobacter spp. collected over 10 years in three continents*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 756-8.

244. Poirel, L., et al., *Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(1): p. 15-22.
245. Poirel, L., A. Potron, and P. Nordmann, *OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(7): p. 1597-606.
246. Antunes, N.T. and J.F. Fisher, *Acquired Class D beta-Lactamases*. Antibiotics (Basel), 2014. **3**(3): p. 398-434.
247. Cohen Stuart, J., M.A. Leverstein-Van Hall, and M. Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant, *Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36**(3): p. 205-10.
248. Bratu, S., et al., *Emergence of KPC-possessing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 3018-20.
249. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement (June 2010 update)*. CLSI document M100-S20-U. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
250. Miriagou, V., et al., *Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(2): p. 112-22.
251. Pasteran, F., et al., *Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(6): p. 1631-9.
252. Mochon, A.B., et al., *New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing Klebsiella pneumoniae: case report and laboratory detection strategies*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(4): p. 1667-70.
253. Centers for Disease, C. and Prevention, *Detection of Enterobacteriaceae isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States, 2010*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010. **59**(24): p. 750.
254. Osano, E., et al., *Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(1): p. 71-8.
255. Giske, C.G., et al., *A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in Klebsiella pneumoniae with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(4): p. 552-6.
256. Tsakris, A., et al., *A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(8): p. 1664-71.
257. Perry, J.D., et al., *Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(10): p. 2288-94.
258. Panagea, T., et al., *Evaluation of CHROMagar KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures*. Int J Antimicrob Agents, 2011. **37**(2): p. 124-8.
259. Samra, Z., et al., *Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 3110-1.
260. Monteiro, J., et al., *Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 906-9.
261. Poirel, L., et al., *Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011. **70**(1): p. 119-23.

262. Voets, G.M., et al., *A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and OXA beta-lactamases*. *Int J Antimicrob Agents*, 2011. **37**(4): p. 356-9.
263. Dallenne, C., et al., *Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 2010. **65**(3): p. 490-5.
264. Bisiklis, A., et al., *Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo-beta-lactamase genes in a single real-time PCR*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. **13**(12): p. 1201-3.
265. Cohen Stuart, J., et al., *Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray*. *J Med Microbiol*, 2012. **61**(Pt 6): p. 809-812.
266. Naas, T., et al., *Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(4): p. 1608-13.
267. Burckhardt, I. and S. Zimmermann, *Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(9): p. 3321-4.
268. Hrabak, J., et al., *Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(9): p. 3222-7.
269. Nordmann, P. and L. Poirel, *The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. **20**(9): p. 821-30.
270. Tsakris, A., et al., *First occurrence of KPC-2-possessing Klebsiella pneumoniae in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests*. *J Antimicrob Chemother*, 2008. **62**(6): p. 1257-60.
271. Zagorianou, A., et al., *Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010*. *Euro Surveill*, 2012. **17**(7).
272. Zarkotou, O., 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**(12): p. 1798-803.
273. Kontopoulou, K., et al., *Hospital outbreak caused by Klebsiella pneumoniae producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin*. *J Hosp Infect*, 2010. **76**(1): p. 70-3.
274. Souli, M., 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**(3): p. 364-73.
275. Pournaras, S., et al., *Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains in Greece*. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **64**(2): p. 348-52.
276. van der Bij, A.K. and J.D. Pitout, *The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 2012. **67**(9): p. 2090-100.
277. Giakkoupi, P., et al., *An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying Klebsiella pneumoniae in Greece (2009-10)*. *J Antimicrob Chemother*, 2011. **66**(7): p. 1510-3.
278. Giakoupi, P., et al., *KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone*. *Euro Surveill*, 2009. **14**(21).
279. Cornaglia, G., et al., *Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe*. *Lancet*, 1999. **353**(9156): p. 899-900.

280. Da Silva, G.J., et al., *Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an Acinetobacter baumannii nosocomial isolate in Portugal*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **215**(1): p. 33-9.
281. Zhao, W.H. and Z.Q. Hu, *IMP-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons*. Crit Rev Microbiol, 2011. **37**(3): p. 214-26.
282. Kouda, S., et al., *Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(1): p. 46-51.
283. Ktari, S., et al., *Emergence of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(12): p. 4198-201.
284. Pournaras, S., et al., *Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(12): p. 4026-8.
285. Berrazeg, M., et al., *New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps*. Euro Surveill, 2014. **19**(20).
286. Lee, C.R., et al., *Global Dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 895.
287. Spyropoulou, A., et al., *The first NDM metallo-beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae isolate in a University Hospital of Southwestern Greece*. J Chemother, 2016. **28**(4): p. 350-1.
288. Voulgari, E., et al., *The Balkan region: NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(8): p. 2091-7.
289. Jeon, J.H., et al., *Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 9654-92.
290. Voulgari, E., et al., *Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece involving an ST11 clone*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(1): p. 84-8.
291. Thurlow, C.J., et al., *Anatomic sites of patient colonization and environmental contamination with Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at long-term acute care hospitals*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2013. **34**(1): p. 56-61.
292. Schechner, V., et al., *Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) among patients with known CRE carriage at their next hospital encounter*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(5): p. 497-503.
293. Souli, M., et al., *Clinical experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(6): p. 847-54.
294. Bradford, P.A., 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**(1): p. 55-60.
295. Ben-David, D., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in post-acute-care facilities in Israel*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(9): p. 845-53.
296. Petersen, K., et al., *Diversity and clinical impact of Acinetobacter baumannii colonization and infection at a military medical center*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 159-66.

297. Wiener-Well, Y., et al., *Carriage rate of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in hospitalised patients during a national outbreak*. J Hosp Infect, 2010. **74**(4): p. 344-9.
298. Akova, M., et al., *Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(5): p. 439-48.
299. Rodriguez-Bano, J. and A. Pascual, *Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008. **6**(5): p. 671-83.
300. Dashti, A.A., et al., *Transmission of a Klebsiella pneumoniae clone harbouring genes for CTX-M-15-like and SHV-112 enzymes in a neonatal intensive care unit of a Kuwaiti hospital*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 6): p. 687-692.
301. Harris, A.D., et al., *Patient-to-patient transmission is important in extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae acquisition*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(10): p. 1347-50.
302. Bagattini, M., et al., *Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(5): p. 979-82.
303. Gastmeier, P., et al., *A cluster of nosocomial Klebsiella pneumoniae bloodstream infections in a neonatal intensive care department: Identification of transmission and intervention*. Am J Infect Control, 2003. **31**(7): p. 424-30.
304. Macrae, M.B., et al., *A simultaneous outbreak on a neonatal unit of two strains of multiply antibiotic resistant Klebsiella pneumoniae controllable only by ward closure*. J Hosp Infect, 2001. **49**(3): p. 183-92.
305. Gorman, L.J., et al., *Cross infection in an intensive care unit by Klebsiella pneumoniae from ventilator condensate*. J Hosp Infect, 1993. **23**(1): p. 27-34.
306. Calbo, E., et al., *Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(6): p. 743-9.
307. Maltezou, H.C., et al., *Outbreak of infections due to KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in Crete (Greece)*. J Infect, 2009. **58**(3): p. 213-9.
308. Chung, K.P., et al., *Arrival of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(5): p. 1182-4.
309. Gregory, C.J., et al., *Outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. **31**(5): p. 476-84.
310. Benenson, S., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae endocarditis in a young adult. Successful treatment with gentamicin and colistin*. Int J Infect Dis, 2009. **13**(5): p. e295-8.
311. Evagelopoulou, P., et al., *Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae mediastinitis safely and effectively treated with prolonged administration of tigecycline*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1932-3.
312. Nguyen, M., et al., *Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. **67**(2): p. 180-4.
313. Wu, D., J. Cai, and J. Liu, *Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. South Med J, 2011. **104**(2): p. 106-10.
314. Kwak, Y.G., et al., *Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae among hospitalized patients*. Microb Drug Resist, 2005. **11**(2): p. 165-9.
315. Li, J., et al., *Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection: a meta-analysis*. J Glob Antimicrob Resist, 2019.

316. Cornaglia, G., H. Giamarellou, and G.M. Rossolini, *Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams?* Lancet Infect Dis, 2011. **11**(5): p. 381-93.
317. Zavascki, A.P., et al., *The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial Pseudomonas aeruginosa infections.* J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(2): p. 387-92.
318. Tzouveleki, L.S., et al., *Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.* Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(9): p. 862-72.
319. Mathers, A.J., et al., *Fatal cross infection by carbapenem-resistant Klebsiella in two liver transplant recipients.* Transpl Infect Dis, 2009. **11**(3): p. 257-65.
320. Drawz, S.M., K.M. Papp-Wallace, and R.A. Bonomo, *New beta-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world.* Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4): p. 1835-46.
321. Wachino, J. and Y. Arakawa, *Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update.* Drug Resist Updat, 2012. **15**(3): p. 133-48.
322. Livermore, D.M., et al., *Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates.* J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(1): p. 48-53.
323. Livermore, D.M., M. Warner, and S. Mushtaq, *Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa.* J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(10): p. 2286-90.
324. Stachyra, T., et al., *In vitro activity of the {beta}-lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases.* J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(2): p. 326-9.
325. Skiada, A., et al., *Adaptive resistance to cationic compounds in Pseudomonas aeruginosa.* Int J Antimicrob Agents, 2011. **37**(3): p. 187-93.
326. Fernandez, L., et al., *Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in Pseudomonas aeruginosa is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS.* Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8): p. 3372-82.
327. Daikos, G.L., et al., *Serum bactericidal activity of three different dosing regimens of colistin with implications for optimum clinical use.* J Chemother, 2010. **22**(3): p. 175-8.
328. Cunha, B.A., *Pharmacokinetic considerations regarding tigecycline for multidrug-resistant (MDR) Klebsiella pneumoniae or MDR Acinetobacter baumannii urosepsis.* J Clin Microbiol, 2009. **47**(5): p. 1613.
329. Burkhardt, O., et al., *Tigecycline possibly underdosed for the treatment of pneumonia: a pharmacokinetic viewpoint.* Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(1): p. 101-2.
330. Agwuh, K.N. and A. MacGowan, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines.* J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(2): p. 256-65.
331. Pontikis, K., et al., *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**(1): p. 52-9.
332. Michalopoulos, A., et al., *Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in critically ill patients: a prospective evaluation.* Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(2): p. 184-6.

333. Daikos, G.L., et al., *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4): p. 2322-8.
334. Tumbarello, M., 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**(7): p. 943-50.
335. Hamamci, N., et al., *A quantitative study of genital skin flora and urinary colonization in spinal cord injured patients*. Spinal Cord, 1998. **36**(9): p. 617-20.
336. Seifert, H., et al., *Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2819-25.
337. Fawcett, C., et al., *A study of the skin flora of spinal cord injured patients*. J Hosp Infect, 1986. **8**(2): p. 149-58.
338. Larson, E.L., et al., *Composition and antimicrobial resistance of skin flora in hospitalized and healthy adults*. J Clin Microbiol, 1986. **23**(3): p. 604-8.
339. Pittet, D., et al., *Bacterial contamination of the hands of hospital staff during routine patient care*. Arch Intern Med, 1999. **159**(8): p. 821-6.
340. Adams, B.G. and T.J. Marrie, *Hand carriage of aerobic gram-negative rods may not be transient*. J Hyg (Lond), 1982. **89**(1): p. 33-46.
341. Grundmann, H., et al., *Detection of cross-transmission of multiresistant Gram-negative bacilli and Staphylococcus aureus in adult intensive care units by routine typing of clinical isolates*. Clin Microbiol Infect, 1999. **5**(6): p. 355-363.
342. Chetchotisakd, P., C.L. Phelps, and A.I. Hartstein, *Assessment of bacterial cross-transmission as a cause of infections in patients in intensive care units*. Clin Infect Dis, 1994. **18**(6): p. 929-37.
343. Morgan, D.J., et al., *Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination*. Crit Care Med, 2012. **40**(4): p. 1045-51.
344. Wiener-Well, Y., et al., *Nursing and physician attire as possible source of nosocomial infections*. Am J Infect Control, 2011. **39**(7): p. 555-9.
345. Wilson, J.A., et al., *Uniform: an evidence review of the microbiological significance of uniforms and uniform policy in the prevention and control of healthcare-associated infections. Report to the Department of Health (England)*. J Hosp Infect, 2007. **66**(4): p. 301-7.
346. Lee, A., et al., *Hand hygiene practices and adherence determinants in surgical wards across Europe and Israel: a multicenter observational study*. Am J Infect Control, 2011. **39**(6): p. 517-20.
347. Siegel, J.D., et al., *Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006*. Am J Infect Control, 2007. **35**(10 Suppl 2): p. S165-93.
348. Maragakis, L.L., et al., *Incidence and prevalence of multidrug-resistant acinetobacter using targeted active surveillance cultures*. JAMA, 2008. **299**(21): p. 2513-4.
349. Harris, A.D., et al., *Co-carriage rates of vancomycin-resistant Enterococcus and extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patients: implications for an active surveillance program*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2004. **25**(2): p. 105-8.
350. Buehlmann, M., et al., *The inguinal skin: an important site of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. **31**(4): p. 427-8.
351. Papadomichelakis, E., et al., *Screening for resistant gram-negative microorganisms to guide empiric therapy of subsequent infection*. Intensive Care Med, 2008. **34**(12): p. 2169-75.

352. Snyder, G.M. and E.M. D'Agata, *Diagnostic accuracy of surveillance cultures to detect gastrointestinal colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria*. Am J Infect Control, 2012. **40**(5): p. 474-6.
353. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 256–260.
354. Dancer, S.J., *Hospital cleaning in the 21st century*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. **30**(12): p. 1473-81.
355. Weber, D.J., et al., *Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species*. Am J Infect Control, 2010. **38**(5 Suppl 1): p. S25-33.
356. Kramer, A., I. Schwebke, and G. Kampf, *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 130.
357. Lemmen, S.W., et al., *Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment*. J Hosp Infect, 2004. **56**(3): p. 191-7.
358. Sanderson, P.J. and K.M. Alshafi, *Environmental contamination by organisms causing urinary tract infection*. J Hosp Infect, 1995. **29**(4): p. 301-3.
359. Sanderson, P.J. and P. Rawal, *Contamination of the environment of spinal cord injured patients by organisms causing urinary-tract infection*. J Hosp Infect, 1987. **10**(2): p. 173-8.
360. Tacconelli, E., et al., *Antibiotic usage and risk of colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria: a hospital population-based study*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(10): p. 4264-9.
361. Lopez-Lozano, J.M., et al., *Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis*. Int J Antimicrob Agents, 2000. **14**(1): p. 21-31.
362. Huttner, B., et al., *Decolonization of intestinal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae with oral colistin and neomycin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Antimicrob Chemother, 2013. **68**(10): p. 2375-82.
363. Troche, G., et al., *Detection and treatment of antibiotic-resistant bacterial carriage in a surgical intensive care unit: a 6-year prospective survey*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. **26**(2): p. 161-5.
364. Taylor, M.E. and B.A. Oppenheim, *Selective decontamination of the gastrointestinal tract as an infection control measure*. J Hosp Infect, 1991. **17**(4): p. 271-8.
365. Brun-Buisson, C., et al., *Intestinal decontamination for control of nosocomial multiresistant gram-negative bacilli. Study of an outbreak in an intensive care unit*. Ann Intern Med, 1989. **110**(11): p. 873-81.
366. Saidel-Odes, L., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae carriage*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2012. **33**(1): p. 14-9.
367. Vernon, M.O., et al., *Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit: the effectiveness of source control to reduce the bioburden of vancomycin-resistant enterococci*. Arch Intern Med, 2006. **166**(3): p. 306-12.
368. Huang, S.S., et al., *Targeted versus universal decolonization to prevent ICU infection*. N Engl J Med, 2013. **368**(24): p. 2255-65.
369. Climo, M.W., et al., *Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection*. N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 533-42.

370. Stickler, D.J., *Susceptibility of antibiotic-resistant gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms*. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 2002(31): p. 163S-170S.
371. Tzouveleakis, L.S., et al., *Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(4): p. 682-707.
372. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018*. Stockholm: ECDC; 2019.
373. Maltezou, H.C., 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**(1): p. 11-16.
374. Kritsotakis, E.I., et al., *Prevalence, incidence burden, and clinical impact of healthcare-associated infections and antimicrobial resistance: a national prevalent cohort study in acute care hospitals in Greece*. Infect Drug Resist, 2017. **10**: p. 317-328.
375. Kousouli, E., et al., *Infection control interventions affected by resource shortages: impact on the incidence of bacteremias caused by carbapenem-resistant pathogens*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018. **37**(1): p. 43-50.
376. Gautom, R.K., *Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2977-80.
377. David, S., et al., *Epidemic of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Europe is driven by nosocomial spread*. Nat Microbiol, 2019. **4**(11): p. 1919-1929.
378. Tacconelli, E., et al., *ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers*. Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(7): p. 807-817.
379. Magiorakos, A.P., et al., *Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae into healthcare settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control*. Antimicrob Resist Infect Control, 2017. **6**: p. 113.
380. Friedman, N.D., et al., *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Strategic Roadmap for Infection Control*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2017. **38**(5): p. 580-594.
381. Ben-David, D., et al., *Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. **31**(6): p. 620-6.
382. Calfee, D. and S.G. Jenkins, *Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in intensive care unit patients*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(10): p. 966-8.
383. DalBen, M.F., et al., *A Model-Based Strategy to Control the Spread of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Simulate and Implement*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2016. **37**(11): p. 1315-1322.
384. Viale, P., et al., *Impact of a hospital-wide multifaceted programme for reducing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections in a large teaching hospital in northern Italy*. Clin Microbiol Infect, 2015. **21**(3): p. 242-7.
385. Hayden, M.K., et al., *Prevention of colonization and infection by Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(8): p. 1153-61.
386. Gagliotti, C., et al., *Control of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: a region-wide intervention*. Euro Surveill, 2014. **19**(43).

387. Borer, A., et al., *A multifaceted intervention strategy for eradication of a hospital-wide outbreak caused by carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Southern Israel*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011. **32**(12): p. 1158-65.
388. Ciobotaro, P., et al., *An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strain in an acute care setting: from theory to practice*. Am J Infect Control, 2011. **39**(8): p. 671-677.
389. Schwaber, M.J., 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**(7): p. 848-55.
390. Munoz-Price, L.S., et al., *Successful control of an outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae at a long-term acute care hospital*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010. **31**(4): p. 341-7.
391. Munoz-Price, L.S. and J.P. Quinn, *Deconstructing the infection control bundles for the containment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. Curr Opin Infect Dis, 2013. **26**(4): p. 378-87.
392. Poulou, A., et al., *Imported Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae clones in a Greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(8): p. 2618-23.
393. Agodi, A., et al., *Containment of an outbreak of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Italy*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3986-9.
394. Trecarichi, E.M., et al., *Bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae in onco-hematological patients: clinical impact of carbapenem resistance in a multicentre prospective survey*. Am J Hematol, 2016. **91**(11): p. 1076-1081.
395. Tofas, P., et al., *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections in neutropenic patients with haematological malignancies or aplastic anaemia: Analysis of 50 cases*. Int J Antimicrob Agents, 2016. **47**(4): p. 335-9.
396. Girmenia, C., et al., *Infections by carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in SCT recipients: a nationwide retrospective survey from Italy*. Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(2): p. 282-8.