

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗ ΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ «ΛΑΪΚΟ»

Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας

«Γ. Κ. Δαΐκος»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Π. Π. Σφηκάκης

---

«Προσδιορισμός των παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη  
*Enterobacteriales* που παράγουν καρβαπενεμάσες ασθενών που  
εισάγονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο»

ΧΡΥΣΑΝΘΗ Α. ΠΑΠΑΦΩΤΙΟΥ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΑΘΗΝΑ 2022

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,  
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ  
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ  
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ  
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘ  
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ  
Ν ΊΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ  
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ  
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ  
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,  
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ  
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ  
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ  
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΝΟ  
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ  
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ  
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ  
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ  
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ  
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ  
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ  
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ  
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ  
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ  
ΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,  
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ  
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ  
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΞΥ  
ΝΔΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ  
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,  
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β  
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ  
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ  
ΙΑΥΤΑ. 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 ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ  
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

■

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

## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου 28-5-2014

Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής 22-9-2014

Μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κ.κ.:

Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Ομότιμος Καθηγητής Παν/μίου Αθηνών (Επιβλέπον μέλος)

Μιχαήλ Σαμάρκος, Καθηγητής Παν/μίου Αθηνών

Μήνα Ψυχογιού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παν/μίου Αθηνών

Ημερομηνία ορισμού θέματος 16-3-2015

Ημερομηνία κατάθεσης 1ης έκθεσης προόδου 15-7-2016

Ημερομηνία κατάθεσης 2ης έκθεσης προόδου 03-04-2018

Ημερομηνία κατάθεσης 3ης έκθεσης προόδου 13-05-2021

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής 30-09-2022

Ορισμός της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής 13-10-2022  
αρ.πρωτοκόλλου 105857

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

Γεώργιος Λ. Δαΐκος, Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μιχαήλ Σαμάρκος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μήνα Ψυχογιού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Σπυρίδων Πουρνάρας, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μίχος Αθανάσιος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Βασιλική – Αναστασία Σύψα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Γαρυφαλλιά Πουλάκου, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Ημερομηνία κρίσεως διδακτορικής διατριβής: 22-11-2022

Βαθμός Αριστα

# Βιογραφικό σημείωμα

Όνοματεπώνυμο: **Χρυσάνθη Α. Παπαφωτίου**

Ημερομηνία γέννησης: 22 Ιουνίου 1987

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Ηλεκτρονική αλληλογραφία: [chryspapafotiou@gmail.com](mailto:chryspapafotiou@gmail.com)

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

*09/2014–11/2022*

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα: «Προσδιορισμός των παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη *Enterobacteriales* που παράγουν καρβαπενεμάσες ασθενών που εισάγονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο», επιβλέπων: Καθ. Γ.Λ. Δαΐκος

*07/07/2020*

Απόκτηση τίτλου ειδίκευσης στην Παιδιατρική

*03/2017-07/2022*

Γενικό Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία», Α΄ Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών: Ειδίκευση στην Παιδιατρική για 3 έτη (σε παράταση ειδικότητας με τίτλο για 2 έτη)

*11/2015-02/2017*

Γενικό Νοσοκομείο Μυτιλήνης «Βοστάνειο»: Ειδίκευση στην Παιδιατρική (15 μήνες)

*09/2013-10/2016*

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα: «Συγχρονική Μελέτη σύγκρισης Σωματομετρικών Χαρακτηριστικών, Δεικτών του Μεταβολισμού και Δεικτών του Συστήματος του Στρες σε προεφηβικά κορίτσια», Ιατρείο Παχυσαρκίας μονάδας Αναπτυξιακής και Συμπεριφορικής Παιδιατρικής Νοσοκομείου 'Η Αγ. Σοφία', επιβλέπουσα: Αναπ. Καθ. Π. Περβανίδου

*2012-2013*

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Έλεγχος του στρες και προαγωγή της Υγείας», Βαθμός: 9,06 «Άριστα»

*02/2012*

Εκπαίδευση αγροτικού ιατρού - Χειρουργικό και Παθολογικό τμήμα Γενικού Νοσοκομείου Κορίνθου

*2005-2011*

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή. Τρόπος εισαγωγής: Πανελλήνιες εξετάσεις. Βαθμός πτυχίου: 7,33 «Λίαν Καλώς»

*2005*

1<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Κορίνθου - Απολυτήριο Λυκείου. Βαθμός: 19,5 «Άριστα»

## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

8/7/2022-σήμερα

Άσκηση της Παιδιατρικής ως ιδιώτης Παιδίατρος, Κόρινθος

05/2014-10/2014

Διενέργεια φλεβοκεντήσεων και ιατρική παρακολούθηση εθελοντών στο πλαίσιο του ευρωπαϊκού προγράμματος με τίτλο: «Κατανοώντας τους μηχανισμούς τροφής-εντέρου-εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της ζωής στη ρύθμιση της πείνας και του κορεσμού για την υγεία: Full4Health» - Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο - Ευρωπαϊκή Ένωση

01/2012-03/2013

Υπηρεσία υπαίθρου – Π.Ι Φενεού, Κ.Υ Γκούρας, Γ.Ν Κορίνθου

04/2012-08/2012

Ιατρός εξορμήσεων Αιμοδοσίας Γ.Ν. Κορίνθου

05/2012

Ιατρός του Rally Acropolis 2012

2011

Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος

## ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

### Σεμινάρια

Λήψη πιστοποίησης στα ακόλουθα:

*Pediatric Life Support, Basic and Advanced Care, Training Lectures and skills & scenarios:* 19-21 Απριλίου 2016, Γενικό Νοσοκομείο Μυτιλήνης. Οργάνωση: Pediatric Intensive Care Unit, Emma Children's Hospital AMC, Amsterdam, The Netherlands

*European Paediatric Life Support (EPLS):* 6-7 Οκτωβρίου 2012, Ερ.Ντυνάν, Ελ.Εταιρεία ΚΑΡΠΑ

*Advanced Cardiac Life Support (ACLS):* 8-10 Ιουνίου 2012, Ερ.Ντυνάν, Ελ.Εταιρεία ΚΑΡΠΑ

*Newborn Life Support (NLS):* 19 Μαΐου 2012, Ερ.Ντυνάν, Ελ.Εταιρεία ΚΑΡΠΑ, 11 Δεκεμβρίου 2022, Ελ.Εταιρεία ΚΑΡΠΑ

*Basic Life Support (BLS/AED):* 17 Μαρτίου 2012, Ωνάσειο Κ/Χ Κέντρο

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ - ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. *Papafotiou C, Roussos S, Sypsa V, Bampali S, Spyridopoulou K, Karapanou A, Moussouli A, Samarkos M, Daikos GL, Psychogiou M.* Predictive score for patients with carbapenemase-producing enterobacterales colonization upon admission in a tertiary care hospital in an endemic area. **J Antimicrob Chemother.** 2022 Oct 7: dkac321. doi: 10.1093/jac/dkac321. PMID: 36203392
2. *Papafotiou C, Christaki E, van den Akker E., Wester, V.L. Apostolakou F, Papassotiriou I, Chrousos G.P, Pervanidou P.* Hair cortisol concentrations exhibit a positive association with salivary cortisol profiles and are increased in obese prepubertal girls. **Stress** 2017, 20, 217–222

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. *Χρυσάνθη Παπαφωτίου, Μιχάλης Κασταμούλας, Ελισάβετ Γεωργιάδου, Ιωάννης Αναστασόπουλος, Βασιλική Δερμεντζόγλου, Ευαγγελία Λυκοπούλου*  
Περίπτωση νηπίου με σιτιογενή ραχίτιδα σε έδαφος τροφικής αλλεργίας. Αναρτημένη ανακοίνωση (AA075), 57<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, **14-16/6/2019**, Πάτρα
2. *Χρυσάνθη Παπαφωτίου, Ελένη Θεοδώρου, Μαρία Γιαννίκη, Πασχαλιά Κοπάνου-Ταλιάκα, Ελένη Χαραλάμπους, Αναστασία Βαρβαρήγου, Αθανασία Λουρίδα, Θεώνη Πετροπούλου*  
Οστική προσβολή σε έφηβο με συστηματική μαρτονέλλωση. Αναρτημένη ανακοίνωση (AA187), 57<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, **14-16/6/2019**, Πάτρα
3. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Γεωργιάδου Ελισάβετ, Ανδρεώτη Αρετή, Μηλίγκος Μιχάλης, Πολυτάρχου Νατάσα, Λαμπροπούλου Ευγενία, Λουρίδα Αθανασία, Μίχος Αθανάσιος, Μπότσα Ευανθία, Λυκοπούλου Αίλια*  
Περίπτωση εφήβου με φυματιώδη πλευρίτιδα. Αναρτημένη ανακοίνωση (AA20), 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων, **14-16/12/2018**, Αθήνα
4. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Γεωργιάδου Ελισάβετ, Ανδρεώτη Αρετή, Παπαγεωργίου Νεφέλη, Μηλίγκος Μιχάλης, Μουδάκη Αγγελική, Μπαμπαλίτσα Σοφία, Μπότσα Ευανθία, Λυκοπούλου Αίλια*  
Περίπτωση εφήβου με παρατεινόμενο εμπύρετο και εξάνθημα στο πλαίσιο ενδημικού τύφου. Αναρτημένη ανακοίνωση (AA55), 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων, **14-16/12/2018**, Αθήνα
5. *Λυκοπούλου Αίλια, Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Καναβάκη Ινώ, Φιορεντίν Λίνα, Γαλήνα Παρασκευή, Στεφανάκη Καλλιόπη, Πατερέλη Αμαλία, Ρογαλίδου Μαρία, Δημάκου Κωνσταντίνα, Κωσταρίδου Σταυρούλα, Ζέλλου Αίγλη*  
Έφηβος με αιφνίδιας έναρξης κνησμό και χολοστατικό ίκτερο στα πλαίσια νέας μετάλλαξης οικογενούς προοδευτικής ενδοηπατικής χολόστασης τύπου 2 (pfic-2). Αναρτημένη Ανακοίνωση (AA11), 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας και Διατροφής, **12-14/10/2018**, Αθήνα
6. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Ορφανού Ειρήνη, Δημάκου Κωνσταντίνα, Ρογαλίδου Μαρία, Στεφανάκη Καλλιόπη, Τεπελένης Νικόλαος, Παπαδοπούλου Αλεξάνδρα*  
Έφηβος με σημαντική αναιμία στα πλαίσια κολλαγονώδους γαστρίτιδας. Αναρτημένη Ανακοίνωση (AA34), 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας και Διατροφής, **12-14/10/2018**, Αθήνα
7. *Αίλια Λυκοπούλου, Χρυσάνθη Παπαφωτίου, Μαρία Ρογαλίδου, Ινώ Καναβάκη, Μαρία Μωραΐτου, Ειρήνη Μαυρίδου, Πηνελόπη Μαντά, Ελένη Μιχελακάκη, Αίγλη Ζέλλου*  
Γλυκογονίαση τύπου IXa σε δύο αγόρια. Ελεύθερη ανακοίνωση (EA16), 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας και Διατροφής, **12-14/10/2018**, Αθήνα
8. *Χρυσάνθη Παπαφωτίου, Μιχαέλα Νικολάου, Μαρία Δίκου, Βασιλική Τσεκούρα, Σοφία Τσιακίρη, Ιωάννα Καλαϊτζίδου, Ελένη Καλλέργη, Μαρία Παναρέτου, Χριστίνα Μόσχου, Ελένη Βλουτή*  
Καταγραφή εισαγωγών και ανοσοποίησης παιδιατρικού πληθυσμού προσφύγων – μεταναστών στο Γενικό Νοσοκομείο Μυτιλήνης «ΒΟΣΤΑΝΕΙΟ» - Σύγκριση με δεδομένα προηγούμενου έτους. Ελεύθερη Ανακοίνωση. 55<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, **2-4/6/2017**, Κως
9. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Χριστάκη Ειρήνη, van den Akker Erica, Wester Vincent, Αποστολάκου Φιλία, Παπασωτηρίου Ιωάννης, Ευτυχίδου Αναστασία, Χρούσος Γεώργιος, Περβανίδου Παναγιώτα*  
Οι τιμές κορτιζόλης τρίχας σχετίζονται θετικά με την ημερήσια συγκέντρωση κορτιζόλης σιέλου και εμφανίζονται αυξημένες σε παχύσαρκα προεφηβικά κορίτσια. Δημερίδα

Αναπτυξιακής και Συμπεριφορικής Παιδιατρικής, **19-20/11/2016**, Χωρέμειο Ερευνητικό Κέντρο, Αθήνα

10. *Μιχαέλα Νικολάου, Κατερίνα Κουρτέση, Χρυσάνθη Παπαφωτίου, Μαρία Δίκου, Βασιλική Τσεκούρα, Ελένη Βλουτή, Χριστίνα Μόσχου*

Καταγραφή παιδιατρικού πληθυσμού προσφύγων – μεταναστών στο Γενικό Νοσοκομείο Μυτιλήνης «ΒΟΣΤΑΝΕΙΟ»: Υπάρχει κίνδυνος για μεταδοτικές ασθένειες; Αναρτημένη Ανακοίνωση (EA57). 54ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, **17-19/6/2016**, Ιωάννινα

11. *Ε. Χριστάκη, Χ. Παπαφωτίου, E.L.T. Van Den Akker, V.L. Wester, Φ. Αποστολάκου, Δ. Μπαστάκη, D. Boschiero, Π. Περβανίδου, Γ. Χρούσος*

Θετικές συσχετίσεις μεταξύ λιπώδους ιστού και συγκέντρωση κορτιζόλης σιέλου, τρίχας και ινσουλίνης νηστείας και συσχέτιση του ΔΜΣ με την κορτιζόλη τρίχας σε προεφηβικά κορίτσια. 9ο Εντατικό Σεμινάριο Εφηβικής Ιατρικής 2016 «State of the Art», **1-2/4/2016**, Αμερικάνικο Κολλέγιο, Αθήνα. Abstract book: E.A 11, σελ 20.

**Η ελεύθερη ανακοίνωση βραβεύτηκε με το 1ο βραβείο της Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρίας**

12. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Χριστάκη Ειρήνη, Αποστολάκου Φιλία, Παπασωτηρίου Ιωάννης, Χρούσος Γεώργιος, Περβανίδου Παναγιώτα*

Ασυμμετρία στην ενεργοποίηση του άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Επινεφρίδια (HPA) και του Συμπαθητικού Συστήματος σε παχύσαρκα προεφηβικά κορίτσια. Προφορική ανακοίνωση. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδικής & Εφηβικής Ενδοκρινολογίας, **27-28/2/2016**, Αθήνα

13. *Ε. Χριστάκη, Χ. Παπαφωτίου, E.L.T. van den Akker, V.L. Wester, Φ. Αποστολάκου, Ι. Παπασωτηρίου, D. Boschiero, Γ. Χρούσος, Χ. Κανακά-Gantenbein, Π. Περβανίδου*

Θετικές συσχετίσεις μεταξύ λιπώδους ιστού και συγκεντρώσεων κορτιζόλης σιέλου, τρίχας και ινσουλίνης νηστείας σε προεφηβικά κορίτσια. Προφορική ανακοίνωση. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδικής & Εφηβικής Ενδοκρινολογίας, **27-28/2/2016** Αθήνα

14. *Ε. Χριστάκη, Χ. Παπαφωτίου, Δ. Μπαστάκη, E.L.T. van den Akker, Γ. Χρούσος, Π. Περβανίδου*

Αυξημένες συγκεντρώσεις κορτιζόλης τρίχας σε παχύσαρκα σε σχέση με φυσιολογικού βάρους προεφηβικά κορίτσια. Προφορική ανακοίνωση. 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδικής & Εφηβικής Ενδοκρινολογίας, **27-28/2/2016**, Αθήνα

15. *Χ. Παπαφωτίου, Ε. Χριστάκη, Π. Περβανίδου, Φ. Αποστολάκου, Ι. Παπασωτηρίου, Γ. Χρούσος*

Η παχυσαρκία σε προεφηβικά κορίτσια συνοδεύεται από ασυμμετρία μεταξύ των δύο αξόνων του συστήματος του στρες. Προφορική ανακοίνωση. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναπτυξιακής - Συμπεριφορικής Παιδιατρικής & Εφηβικής Υγείας – Ιατρικής, **21-22/11/15**, Αίγλη Ζαπτείου, Αθήνα

16. *Παπαφωτίου Χρυσάνθη, Χριστάκη Ειρήνη, Περβανίδου Παναγιώτα, Αποστολάκου Φιλία, Παπασωτηρίου Ιωάννης, Μπαστάκη Δέσποινα, Χρούσος Γεώργιος*

Τα συναισθηματικά και συμπεριφορικά προβλήματα προεφηβικών κοριτσιών σχετίζονται περισσότερο με το βάρος, από ότι με το στρες. Προφορική ανακοίνωση. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναπτυξιακής - Συμπεριφορικής Παιδιατρικής & Εφηβικής Υγείας – Ιατρικής, **21-22/11/15**, Αίγλη Ζαπτείου, Αθήνα

17. *Ε. Χριστάκη, Χ. Παπαφωτίου, E.L.T. van den Akker, V.L. Wester, Φ. Αποστολάκου, Ι. Παπασωτηρίου Δ. Μπαστάκη, Γ. Χρούσος, Π. Περβανίδου*

Τα παιδιά με παχυσαρκία παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές κορτιζόλης τρίχας σε σχέση με τα παιδιά με φυσιολογικό σωματικό βάρος. Προφορική ανακοίνωση. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναπτυξιακής - Συμπεριφορικής Παιδιατρικής & Εφηβικής Υγείας – Ιατρικής, **21-22/11/15**, Αίγλη Ζαπτείου, Αθήνα

18. *Ε. Χριστάκη, Χ. Παπαφωτίου, E.L.T. van den Akker, V.L. Wester, Φ. Αποστολάκου, Ι.*

Παπασωτηρίου, Δ. Μπαστάκη, Γ. Χρούσος, Π. Περβανίδου

Τα αυξημένα επίπεδα λιπώδους ιστού συσχετίζονται θετικά με τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σιέλου, κορτιζόλης τρίχας και ινσουλίνης νηστείας σε προεφηβικά κορίτσια. Προφορική ανακοίνωση. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναπτυξιακής - Συμπεριφορικής Παιδιατρικής & Εφηβικής Υγείας – Ιατρικής, **21-22/11/15**, Αίγλη Ζαπτείου, Αθήνα

19. 16-18/04/2010: «Νομικά Θέματα και Ηθικά Διλήμματα που προκύπτουν από την Εφηβική Υπογονιμότητα» - Προφορική ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής, Στρογγυλή Τράπεζα Γυναικολογίας, Υπεύθυνος: Καθ. Ε. Δεληγεώρογλου
20. 20-22/04/2007: «Επιδημιολογία και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί Σακχαρώδους Διαβήτη τ.Ι» - Προφορική ανακοίνωση στο 13<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής, Στρογγυλή Τράπεζα Παιδιατρικής, Υπεύθυνος: Ομ.καθ. Χ.Μπαρτζόκας

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. *Chrysanthe Papafotiou, Sofia Bampali, Sotiris Roussos, Vana Sypsa, Tania Moussouli, Michail, Samarkos, Mina Psychogiou, Kalliopi Spyridopoulou, Amalia Karapanou, George L.Daikos*  
Prediction model for carbapenemase-producing Enterobacteriales colonization upon admission to hospital in an endemic geographic area. Poster presentation. 30<sup>th</sup> ECCMID, **18-21/4/2020**, Paris, France, Abstract 6758
2. *Lilia Lykopoulou, Chrysanthe Papafotiou, Elissavet Georgiadou, Irene Mavridou, Marina Moraitou, Dirk Lefeber, Helen Michelakakis.*  
Glycogen storage disease type IXa in two boys. Poster presentation. Society for the study of inborn errors of metabolism's (SSIEM) Annual Symposium, **4-7/9/2018**, Athens, Greece, E-128
3. *Chrysanthe Papafotiou, Eirini Christaki, Panagiota Pervanidou, Filia Apostolakou, Ioannis Papassotiriou, George P. Chrousos*  
Asymmetry between hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis and sympathetic nervous system activation in obese prepubertal girls. ENDO 2016, **1-4/4/2016**, Boston, MA. Poster Board SAT 616
4. *Chrysanthe Papafotiou, Eirini Christaki, Erica L.T.Van den Akker, Vincent L. Wester. Filia Apostolakou, Ioannis Papassotiriou, George P. Chrousos, Panagiota Pervanidou*  
Hair cortisol concentrations correlate with daily salivary levels and are increased in obese prepubertal girls. ENDO 2016, **1-4/4/2016**, Boston, MA. Poster Board FRI 617
5. *Eirini Christaki, Chrysanthe Papafotiou, Erica L.T. van den Akker, Vincent L. Wester, Despoina Bastaki, Filia Apostolakou, Dario Boschiero, Ioannis Papassotiriou, George P. Chrousos and Panagiota Pervanidou*  
Excessive Body Fat Accumulation in Prepubertal Girls Correlates Positively with Hair and Salivary Cortisol Levels and Serum Fasting Insulin Concentrations. ENDO 2016, **1-4/4/2016**, Boston, MA. Poster Board FRI 618
6. *Chrysanthe Papafotiou, Eirini Christaki, Erica van den Akker, Vincent Wester, Filia Apostolakou, Ioannis Papassotiriou, George Chrousos, Panagiota Pervanidou*  
Increased Salivary and Hair Cortisol and Decreased Salivary Alpha-Amylase Concentrations in Obese Prepubertal Girls. Poster presentation. The 55th annual ESPE meeting, **10 - 12 September 2016**, Paris, France, P1-P21
7. *Eirini Christaki, Chrysanthe Papafotiou, Despoina Bastaki, Erica L.T. van den Akker, Vincent L. Wester, Dario Boschiero, Panagiota Pervanidou, Christina Kanaka-Gantenbein, George Chrousos.*  
BMI Correlates Positively with Hair Cortisol, whereas Excessive Body Fat Correlates



Positively with Hair Cortisol: Salivary Cortisol and Fasting Insulin Concentrations in Prepubertal Girls. Poster presentation. The 55th annual ESPE meeting, **10 - 12 September 2016**, Paris, France, P1-P478

#### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

**Αγγλικά:** Certificate of Proficiency in English, University of Michigan

**Γαλλικά:** Diplôme d'études en langue française DELF, 1er degré

**Γερμανικά:** Goethe-Zertifikat B2

#### **ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ**

- Δίπλωμα ECDL
- Αξιοποίηση δεδομένων με χρήση στατιστικού λογισμικού (SPSS)
- Διήμερο εκπαιδευτικό σεμινάριο (10 ώρες): «Εισαγωγή στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS STATISTICS: Βασικά θέματα επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων», Υπολογιστικό Κέντρο, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών **24-25/11/2014**

## Πρόλογος

Η αυξανόμενη επίπτωση και η παγκόσμια διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Εντεροβακτηριακών (CRE) αποτελούν ανησυχητικά φαινόμενα της τελευταίας δεκαετίας και σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία διεθνώς, πολλώ δε μάλλον για την Ελλάδα. Οι καρβαπενέμες μέχρι πρότινος αποτελούσαν μία ισχυρή θεραπευτική επιλογή έναντι των απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη αντοχής των Εντεροβακτηριακών και στις καρβαπενέμες και η εισαγωγή τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον αποτελεί κυρίαρχη απειλή για τους νοσηλευόμενους ασθενείς και μία νέα θεραπευτική πρόκληση.

Τα στελέχη αυτά προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις σε εξασθενημένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, οι οποίες σχετίζονται με παρατεταμένη νοσηλεία και υψηλά ποσοστά θνητότητας. Παρ' όλη τη χρήση νέων αντιμικροβιακών το πρόβλημα δεν έχει λυθεί. Ο ασυμπτωματικός αποικισμός με CPE στο γαστρεντερικό σύστημα θεωρείται ως η κυρίαρχη πηγή συνεχούς μετάδοσης. Αναδεικνύεται λοιπόν η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσης και λήψης μέτρων περιορισμού της ενδονοσοκομειακής εξάπλωσης τέτοιου είδους μικροβίων. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα ήταν χρήσιμη η εφαρμογή μίας απλής, ταχείας και αποτελεσματικής δοκιμασίας ανίχνευσης των εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες (carbapenemase-producing Enterobacterales, CPE).

Πλην της έγκαιρης ανίχνευσης μέσω της κατάλληλης δοκιμασίας κρίνεται απαραίτητη και η στοχευμένη ανίχνευση, δεδομένου του μεγάλου όγκου ασθενών που προσέρχεται στα δημόσια νοσοκομεία και των περιορισμένων διαθέσιμων πόρων. Πολλές μελέτες έχουν αναζητήσει και έχουν εντοπίσει παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από CPE, χωρίς ωστόσο να υπάρχει προς το παρόν μία ευρείας αποδοχής μέθοδος ποσοτικοποίησης του κινδύνου και διαστρωμάτωσης των ασθενών βάσει αυτού. Αναδύεται έτσι η ανάγκη δημιουργίας ενός δείκτη πρόβλεψης βασισμένου στους παράγοντες κινδύνου κάθε ασθενούς, με στόχο την επιλεκτική εφαρμογή ελέγχου αποικισμού και την εφαρμογή περαιτέρω θεραπευτικών μέτρων και μέτρων πρόληψης διασποράς.

Τις ανάγκες αυτές επιχείρησε να καλύψει η παρούσα μελέτη, η οποία εκπονήθηκε κατά τα έτη 2015-2016 στο «Γ.Ν.Α. Λαϊκό», ένα περιβάλλον με συνεχείς προκλήσεις από την εισαγωγή αποικισμένων ασθενών ή ασθενών με λοίμωξη από CPE. Ο πληθυσμός της μελέτης απαρτίστηκε από ασθενείς που εισήχθησαν σε παθολογικά και χειρουργικά τμήματα του νοσοκομείου σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους των παραπάνω ετών, στους οποίους

έγινε έλεγχος αποικισμού με CPE και καταγραφή του ατομικού τους ιστορικού για τον προσδιορισμό παραγόντων κινδύνου. Το εργαστηριακό τμήμα της Διδακτορικής Διατριβής εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαΐκος» της Α' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής και Ειδικής Νοσολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Το παρόν κείμενο αποτελείται από ένα γενικό μέρος, όπου περιγράφονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών με ιδιαίτερη μνεία στην *Klebsiella pneumoniae* που αποτελεί πλέον τον κυριότερο εκπρόσωπο των Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Περιγράφεται επίσης το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής και γίνεται αναφορά στα είδη, την επιδημιολογία και τις μεθόδους ανίχνευσης των καρβαπενεμασών. Τέλος, αναλύεται ο ρόλος του αποικισμού των ασθενών στην ανάπτυξη λοίμωξης και η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσης των ασθενών-φορέων, τόσο για την εφαρμογή κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας, όσο και για την πρόληψη της περαιτέρω νοσοκομειακής διασποράς. Ακολουθεί το ειδικό μέρος, όπου περιγράφεται ο σκοπός, η μεθοδολογία και τα αποτελέσματα της μελέτης, ενώ στο τέλος παρατίθεται η συζήτηση των ευρημάτων.

## *Ευχαριστίες*

Με την ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής εργασίας νιώθω βαθιά ευγνωμοσύνη προς όλους τους συνοδοιπόρους, των οποίων η βοήθεια υπήρξε ανεκτίμητη. Για μένα ήταν ένα μεγάλο και πολύτιμο ταξίδι και μάθημα.

Η ενθάρρυνση για την προσπάθειά μου οφείλεται στην Ομότιμη Καθηγήτρια κα Βασιλική Συριοπούλου, η οποία με εμπιστεύτηκε και με έφερε σε επαφή με τον Καθηγητή, κ. Γεώργιο Δαΐκο. Την ευχαριστώ γι' αυτό απεριόριστα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεώργιο Λ. Δαΐκο, επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, που εμπνεύστηκε και μου εμπιστεύτηκε αυτό το θέμα, με καθοδήγησε όλα αυτά τα χρόνια και υπερκέρασε κάθε δυσκολία που προέκυψε. Αποτέλεσε από τα φοιτητικά μου χρόνια και συνεχίζει να αποτελεί «φάρο» γνώσης, σύνεσης και επιστημοσύνης.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μήνα Ψυχογιού, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη συμβολή της στην εκτέλεση της μελέτης, τη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την επίβλεψη με μαεστρία κατά την ολοκλήρωση της διατριβής. Η προσήνεια και η αποφασιστικότητά της με βοήθησαν και με δίδαξαν πολλά.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχάλη Σαμάρκο, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την υποστήριξη κατά την πορεία της μελέτης, το ενδιαφέρον και τα εποικοδομητικά του σχόλια σε όλα τα στάδια της διατριβής. Αποτέλεσε για εμένα παράδειγμα επιστημονικού επαγγελματισμού και αποτελεσματικότητας.

Ευγνωμοσύνη χρωστάω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Βασιλική - Αναστασία Σύψα, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για τη βοήθεια της στην ερμηνεία και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπως και στο βιοστατιστικό κ. Σωτήρη Ρούσσο, ο οποίος ήταν πάντα «παρών» σε κάθε απορία που προέκυπτε. Δε θα μπορούσα να έχω μεγαλύτερη βοήθεια και καλύτερη συνεργασία. Χωρίς τη συνδρομή τους δε θα είχε πραγματοποιηθεί η διατριβή.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μικροβιολόγους κα Κάλια Σπυριδοπούλου και κα Σοφία Μπάμπαλη για τη σημαντική συνεισφορά τους στη δειγματοληψία και τη μικροβιολογική ανάλυση των στελεχών. Ιδιαίτερος ευχαριστώ την κα Σπυριδοπούλου και για την αβίαστη προσφορά γνώσης, είτε δια ζώσης, είτε μέσω της γραπτής της παρακαταθήκης, δηλ. του διδακτορικού της.

Επίσης ευχαριστώ θερμά το βιολόγο κ. Δημήτριο Γούκο για τη συνεισφορά του και την βοήθειά του στη μοριακή ανάλυση των στελεχών, χωρίς την οποία δε θα είχα φτάσει ως εδώ. Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη νοσηλεύτρια λοιμώξεων κα Αμαλία Καραπάνου, τόσο για τη συνεισφορά της στη δειγματοληψία και τη λήψη ιστορικών, όσο και για την ηθική υποστήριξη σε όλα τα στάδια της διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την κα Τάνια Μουσούλη και τον κ. Δημήτρη Κατσιάνο για τη συμβολή τους στη δειγματοληψία και τη λήψη ιστορικών, καθώς και όλους τους ειδικευόμενους των συμμετεχουσών κλινικών για τη διάθεση επίλυσης κάθε απορίας και τη διευκόλυνση σε κάθε περίπτωση.

Αμέριστη ευγνωμοσύνη οφείλω στο σύζυγό μου, τον αδερφό μου και τους γονείς μου γιατί δε σταμάτησαν ποτέ να με παροτρύνουν να συνεχίσω και με υποστήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τη μητέρα μου για το χρόνο που διέθεσε διαβάζοντας αυτή την εργασία, για τα εποικοδομητικά της σχόλια και γιατί είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

*Στη Μυρσίνη μου, που κάθε μέρα ανθίζει*

## Πίνακας περιεχομένων

<b>Βιογραφικό σημείωμα</b>	<b>4</b>
<b>Πρόλογος</b>	<b>10</b>
<b>Ευχαριστίες</b>	<b>12</b>
<b>Ευρετήρια</b>	<b>17</b>
<i>Ευρετήριο εικόνων</i>	17
<i>Ευρετήριο πινάκων</i>	18
<i>Ευρετήριο διαγραμμάτων</i>	19
<b>Γενικό μέρος</b>	<b>20</b>
1. <i>Εντεροβακτηριακά</i>	21
1.1. Χαρακτηριστικά	21
1.2. Επιδημιολογία	21
1.3. Τα μέλη της οικογένειας <i>Enterobacteriales</i>	22
1.4. Αντιγονική σύσταση	22
1.5. Παθογενετικοί μηχανισμοί Εντεροβακτηριακών για την πρόκληση λοιμώξεων	23
1.6. Κλινικά σύνδρομα	25
2. <i>Klebsiella spp.</i>	26
2.1. Χαρακτηριστικά, ταξινόμηση και επιδημιολογία	26
2.2. Αντιγονική δομή	28
2.3. Παθογενετικοί μηχανισμοί	29
2.4. Λοιμώξεις από <i>K.pneumoniae</i>	34
2.5. Διάγνωση	35
3. <i>Μικροβιακή αντοχή</i>	37
3.1. Ορισμός	37
3.2. Έκταση του προβλήματος	38
3.3. Αίτια	40
3.4. Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής	43
3.5. Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής	46
3.6. Μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά	48
4. <i>Λειτουργική και Μοριακή ταξινόμηση β-Λακταμασών</i>	51
4.1. Καρβαπενεμάσες	51
4.1.2. Ανίχνευση καρβαπενεμασών	59
5. <i>Επιδημιολογία των CPE</i>	68
6. <i>Αποικισμός από CRE</i>	74
6.1. Ορισμός αποικισμένου ασθενούς	74
6.2. Μηχανισμοί μετάδοσης	74
6.3. Ο ρόλος της ενεργού επιτήρησης αποικισμών	75
6.4. Παράγοντες κινδύνου	78
6.5. Διάρκεια αποικισμού	82

7.	<i>Λοιμώξεις από CRE</i>	83
7.1.	Ορισμός CRE λοίμωξης	83
7.2.	Είδη λοιμώξεων	83
7.3.	Παράγοντες κινδύνου	84
7.4.	Κλίμακες αξιολόγησης κινδύνου αποικισμού, λοίμωξης και θνητότητας	85
7.5.	Θεραπεία λοιμώξεων από CRE	87
	<b>Ειδικό μέρος</b>	<b>93</b>
1.	<i>Στόχοι μελέτης</i>	94
2.	<i>Μεθοδολογία</i>	96
2.1.	Σχεδιασμός και διεξαγωγή της μελέτης	96
2.1.1.	Ορισμοί	97
2.1.2.	Ζητήματα ηθικής και προστασίας δεδομένων	98
2.1.3.	Κριτήρια επιλογής	98
2.1.4.	Κριτήρια αποκλεισμού	98
2.1.5.	Συλλογή δεδομένων	98
2.1.6.	Εργαστηριακές μέθοδοι	100
2.1.7.	Στατιστική ανάλυση	101
3.	<i>Αποτελέσματα</i>	103
3.1.	Προσδιορισμός παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη <i>Enterobacterales</i> που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) ασθενών που εισάγονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο	103
3.2.	Δημιουργία μιας κλίμακας κινδύνου (risk score) για αποικισμό με CPE βασισμένης στους παράγοντες κινδύνου	112
3.3.	Συγκριτική αξιολόγηση φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ανίχνευσης φορέας με CPE	119
3.4.	Προσδιορισμός του ποσοστού των αποικισμένων ασθενών που εξελίσσονται σε CPE βακτηριαιμία	124
4.	<i>Συζήτηση</i>	125
5.	<i>Βιβλιογραφία</i>	136



## Ευρετήριο εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Ο ρόλος του ελύτρου στην λοιμογόνο δράση της <i>K.pneumoniae</i> .	28
<b>Εικόνα 2:</b> Δομή και ρόλος του LPS στη λοιμογόνο δράση της <i>K. pneumoniae</i> .	31
<b>Εικόνα 3:</b> «Τέσσερις καλά χαρακτηρισμένοι παράγοντες λοιμογονικότητας σε κλασικά και υπερλοιμογόνα στελέχη <i>K.pneumoniae</i> ».	32
<b>Εικόνα 4:</b> Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων λοιμογονικότητας της <i>K.pneumoniae</i> και της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή.	33
<b>Εικόνα 5:</b> <i>K.pneumoniae</i> σε Gram χρώση	35
<b>Εικόνα 6:</b> <i>K. pneumoniae</i> σε MacConkey agar	36
<b>Εικόνα 7:</b> Θάνατοι που αποδίδονται στη μικροβιακή αντοχή παγκοσμίως και θάνατοι που σχετίζονται με την αντοχή, ανάλογα με το λοιμώδες σύνδρομο, 2019.	40
<b>Εικόνα 8:</b> Κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση (ATC group J01) στην κοινότητα στην Ευρώπη, έτος αναφοράς 2020.	41
<b>Εικόνα 9:</b> Κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση στην κοινότητα (ATC group J01), ανά χώρα, EU/EEA, 2020.	41
<b>Εικόνα 10:</b> Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια μεταφέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά.	45
<b>Εικόνα 11:</b> Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων.	48
<b>Εικόνα 12:</b> Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών.	49
<b>Εικόνα 13:</b> Φάσμα δραστηριότητας των καρβαπενεμασών των Εντεροβακτηριακών.	52
<b>Εικόνα 14:</b> Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά στελεχών που παράγουν KPC ανά χώρα προέλευσης.	54
<b>Εικόνα 15:</b> Κατανομή <i>K.pneumoniae</i> καρβαπενεμάσης (KPC), New-Delhi μεταλλο-β-λακταμάσης (NDM) και OXA-48 καρβαπενεμασών παγκοσμίως.	57
<b>Εικόνα 16:</b> Διασπορά στελεχών που παράγουν OXA-48.	58
<b>Εικόνα 17:</b> Σχηματική αναπαράσταση των κλινικών κατωφλιών και των κατωφλιών screening για τις καρβαπενέμες και τα Εντεροβακτηριακά.	60
<b>Εικόνα 18:</b> Τροποποιημένη δοκιμασία του Hodge (modified Hodge test).	62
<b>Εικόνα 19:</b> Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα τριών δοκιμασιών συνδυασμού δίσκων.	64
<b>Εικόνα 20:</b> Επιδημιολογία των μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες που ανιχνεύονται σε μη-ευαίσθητα στη μεροπενέμη στελέχη Εντεροβακτηριακών.	68

<b>Εικόνα 21:</b> Η κατάσταση στην Ευρώπη όσον αφορά τα CPE και οι τύποι καρβαπενεμάσης σε διάφορες χώρες ή γεωγραφικές περιοχές ως τον Ιανουάριο 2012.	71
<b>Εικόνα 22:</b> Επιδημιολογική κατάσταση των CPE, αξιολόγηση από ειδικούς σε 37 ευρωπαϊκές χώρες, Ιούλιος 2018.	72
<b>Εικόνα 23:</b> Επίδραση μέτρων ελέγχου λοιμώξεων στον επιπολασμό του αποικισμού από CRKP σε ένα ενδημικό περιβάλλον.	77

### Ευρετήριο πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Ταξινόμηση καρβαπενεμασών.	52
<b>Πίνακας 2:</b> Κλινικά breakpoints και τιμές cut-off για τον έλεγχο παραγωγής καρβαπενεμάσης σε <i>Enterobacterales</i> .	59
<b>Πίνακας 3:</b> Κλινικά κατώφλια για την περαιτέρω εξέταση στελεχών Εντεροβακτηριακών για παραγωγή καρβαπενεμασών.	60
<b>Πίνακας 4:</b> Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των συνήθων μεθόδων ανίχνευσης καρβαπενεμασών σε Εντεροβακτηριακά.	67
<b>Πίνακας 5:</b> Κυρίαρχες καρβαπενεμάσες κωδικοποιούμενες από πλασμίδια και ενδημικές περιοχές.	70
<b>Πίνακας 6:</b> Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των συνδυαστικών σχημάτων θεραπείας των CRE.	88
<b>Πίνακας 7:</b> Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των νέων αντιμικροβιακών για τη θεραπεία των CRE.	89
<b>Πίνακας 8:</b> Κατανομή ασθενών και καρβαπενεμασών ανά κλινική στον πληθυσμό προέλευσης (derivation).	105
<b>Πίνακας 9:</b> Κατανομή ασθενών και καρβαπενεμασών ανά κλινική στον πληθυσμό επικύρωσης (validation).	107
<b>Πίνακας 10:</b> Συγκριτικός πίνακας των χαρακτηριστικών του πληθυσμού προέλευσης (derivation) και επικύρωσης (validation).	108
<b>Πίνακας 11:</b> Πολυπαραγοντική ανάλυση παραγόντων κινδύνου αποικισμού με CPE κατά την εισαγωγή σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο και αντίστοιχη βαθμολογία.	111
<b>Πίνακας 12:</b> Επίδοση του μοντέλου σε διαφορετικούς ουδούς (cut-offs) στον πληθυσμό προέλευσης (derivation).	116

<b>Πίνακας 13:</b> Επίδοση του μοντέλου σε διαφορετικούς ουδούς στον πληθυσμό επικύρωσης (validation).	118
<b>Πίνακας 14:</b> Χαρακτηριστικά θετικών δειγμάτων με PCR απευθείας στο ορθικό δείγμα (direct PCR).	120
<b>Πίνακας 15:</b> Χαρακτηριστικά θετικών με φαινοτυπική ανίχνευση δειγμάτων, με ταυτόχρονη αρνητική PCR απευθείας στο ορθικό δείγμα (direct PCR).	121
<b>Πίνακας 16:</b> Σύνοψη των ευρημάτων.	122
<b>Πίνακας 17:</b> Διαξονική κατάταξη των αποτελεσμάτων της direct PCR (θετική ή αρνητική) σε σχέση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκλογής.	124
<b>Πίνακας 18:</b> Επίδοση της direct PCR για την ανίχνευση καρβαπενεμασών σε ορθικά δείγματα.	124

### Ευρετήριο διαγραμμάτων

<b>Διάγραμμα 1:</b> Έλεγχος αποικισμού με CRE σε νοσοκομειακό περιβάλλον.	81
<b>Διάγραμμα 2:</b> Χρονική εξέλιξη των σταδίων της μελέτης.	97
<b>Διάγραμμα 3:</b> Κατανομή ασθενών ανά κλινική στον πληθυσμό προέλευσης.	104
<b>Διάγραμμα 4:</b> Κατανομή ασθενών ανά κλινική στον πληθυσμό επικύρωσης.	106
<b>Διάγραμμα 5:</b> Παράγοντες κινδύνου αποικισμού με CPE ασθενών κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο.	112
<b>Διάγραμμα 6:</b> Εκτίμηση κινδύνου αποικισμού με CPE στον πληθυσμό προέλευσης σε σχέση με την κλίμακα κινδύνου (risk score) που δημιουργήθηκε με βάση τους ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου που ταυτοποιήθηκαν.	113
<b>Διάγραμμα 7:</b> Καμπύλες receiver-operating characteristic (ROC) στον πληθυσμό προέλευσης (derivation) και τον πληθυσμό επικύρωσης (validation).	114
<b>Διάγραμμα 8:</b> Βαθμονόμηση της κλίμακας κινδύνου, με υπολογισμό της συμφωνίας μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων πιθανοτήτων α) στον πληθυσμό προέλευσης και β) στον πληθυσμό επικύρωσης.	115

## *Γενικό μέρος*

# 1. Εντεροβακτηριακά

## 1.1. Χαρακτηριστικά

Η οικογένεια των Εντεροβακτηριακών (*Enterobacteriaceae/Enterobacterales*) είναι ετερογενής ομάδα Gram αρνητικών βακτηρίων, που αποτελείται από περισσότερα από 150 είδη (P. R. Murray, Rosenthal, Kobayashi, & Pfaller, 1998). Αποτελούν μεσαίου μεγέθους (μήκους 1-5  $\mu\text{m}$ ), άσπορα, κινητά με τη βοήθεια μαστίγιων (περίτριχα) ή ακίνητα βακτηρίδια. Αναπτύσσονται αεροβίως και προαιρετικά αναεροβίως, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C (Prescott, Harley, & Klein, 1999). Στο αιματούχο άγαρ σχηματίζουν μικρές γκρι αποικίες, ενώ αναπτύσσονται εξίσου καλά σε McConkey άγαρ. Βάσει της διάσπασης του δισακχαρίτη λακτόζη ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα εντεροβακτηριακά που ζυμώνουν τη λακτόζη (*Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*), τα οποία στο McConkey άγαρ δημιουργούν αποικίες κόκκινου χρώματος, και όσα δε ζυμώνουν τη λακτόζη (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* κ.α.), των οποίων οι αποικίες εμφανίζονται άχρωμες. Επιπλέον, μεταβολίζουν τη D-γλυκόζη με ή χωρίς παραγωγή αερίου και ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη.

Μορφολογικά τα βακτηρίδια είναι ευθέα. Φέρουν ινίδια τα οποία διευκολύνουν την προσκόλλησή τους σε επιφάνειες ή στους βλεννογόνους, ενώ εξιδεικευμένα συζευκτικά ινίδια (sexpili) διαμεσολαβούν την ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών μεταξύ κυττάρων, όπως π.χ. γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (Forbes, Sahm, & Weissfeld, 2002).

## 1.2. Επιδημιολογία

Τα Εντεροβακτηριακά βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος και νερό) και αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας ανθρώπου και ζώων (Αρσένη, 1994a). Συγκεκριμένα, απαντούν στη χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα και του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος. Ωστόσο, πολλά μέλη της οικογένειας απομονώνονται σε κλινικά δείγματα και είναι υπεύθυνα για ευρείας βαρύτητας λοιμώξεις. Ορισμένα είδη είναι πάντοτε παθογόνα (π.χ. *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Yersinia*), ενώ άλλα μπορούν να προκαλέσουν ευκαιριακές λοιμώξεις (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. κ.α.). Δεδομένου ότι αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα, η απομόνωσή τους μπορεί να αντανakλά αποικισμό και όχι πραγματική λοίμωξη (D. Paterson,

2012; Τρυφίνοπούλου, 2013). Τα Εντεροβακτηριακά θεωρούνται επίσης υπεύθυνα για το πλείστο των νοσοκομειακών λοιμώξεων (Mandell, Bennett, & Dolin, 2000; Αρσένη, 1994a). Συχνότερα Εντεροβακτηριακά τα οποία σχετίζονται με κλινικά σύνδρομα είναι το *E.Coli* και σε μικρότερο βαθμό η *Klebsiella* και ο *Proteus*. Παρότι ορισμένα στελέχη *E.Coli* είναι αυστηρώς εντερικά παθογόνα, οι εξωεντερικές λοιμώξεις από *E.Coli*, *Klebsiella* και *Proteus* αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια (Thomas A. Russo & Johnson, 2018; Τρυφίνοπούλου, 2013).

### 1.3. Τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriales*

Η οικογένεια *Enterobacteriales* περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη: *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Habnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluivera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Prividencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenorhabdus* (Παναγιωτακοπούλου, 2013).

### 1.4. Αντιγονική σύσταση

Η οικογένεια των Εντεροβακτηριακών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη χημικών ουσιών στο κυτταρικό τοίχωμα, την κάψα και τις βλεφαρίδες, οι οποίες δρουν και ως αντιγόνα. Ο διαχωρισμός των αντιγόνων σε ομάδες χρησιμεύει και στο διαχωρισμό των Εντεροβακτηριακών σε οροτύπους, ως εξής:

- **Σωματικά αντιγόνα ή αντιγόνα-O:** Είναι το μεταβαλλόμενο πολυσακχαριδικό τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος, είναι ειδικό για κάθε είδος και είναι θερμοανθεκτικό. Ωστόσο, λόγω του ότι παρουσιάζονται ομοιότητες μεταξύ των ειδών, εμφανίζονται διασταυρούμενες αντιδράσεις, π.χ. μεταξύ των αντιγόνων-O της *E.Coli* και της *Shigella*, όπως και μεταξύ της *Salmonella* και του *Citrobacter* (Αρσένη, 1994b).
- **Βλεφαριδικά αντιγόνα ή αντιγόνα-H:** Αποτελούν δομικά συστατικά των βλεφαρίδων και είναι θερμοευαίσθητα. Σε μικροοργανισμούς που φέρουν βλεφαρίδες, οι αντιδράσεις συγκόλλησης μέσω των αντιγόνων-H είναι ταχύτερες και πιο έντονες από αυτές των αντιγόνων-O, δεδομένης της επικράτησης των αντιγόνων-H. Συχνά παράγονται από τους ξενιστές ειδικά για τα αντιγόνα-H αντισώματα, τα οποία ακινητοποιούν τα βακτήρια. Τα

Εντεροβακτηριακά διατηρούν τη λοιμογόνο τους δράση μέσω μηχανισμών ελέγχου και αλλαγής της έκφρασης των αντιγόνων-H, με συνέπεια την αποφυγή της πρόσδεσης των ειδικών αυτών αντισωμάτων (Donnenberg, 2015).

- **Αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα-K:** Είναι πρωτεϊνικά ή πολυσακχαριδικά μόρια, συστατικά του ελύτρου. Το καψιδικό περίβλημα του μικροβίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα μολυσματικότητας (virulence). Ιδιαίτερος στην *Klebsiella* έχουν περιγραφεί περίπου 80 καψιδικά αντιγόνα, με σημαντικότερους τους οροτύπους K1, K2, K3, K5 και K21. Η διαβάθμιση σχετίζεται άμεσα με το ποσοστό μαννόζης του καψιδικού πολυσακχαρίτη. Οι αλληλουχίες μαννόζη-α-2/3-μαννόζη ή L-ραμνόζη-α-2/3-L-ραμνόζη αναγνωρίζονται από τη λεκτίνη στην επιφάνεια του μακροφάγου και ενεργοποιούν μια διεργασία φαγοκύττωσης ανεξάρτητη οψωνίνης, γνωστή ως λεκτινοφαγοκύττωση, η οποία καταλήγει στη θανάτωση του μικροβίου. Μικροβιακά στελέχη τα οποία στερούνται των ανωτέρω καψιδικών αλληλουχιών, δεν φαγοκυτταρώνονται και επομένως καθίστανται μολυσματικότερα (Παναγιωτακοπούλου, 2013).

### **1.5. Παθογενετικοί μηχανισμοί Εντεροβακτηριακών για την πρόκληση λοιμώξεων**

Η ικανότητα των Εντεροβακτηριακών να προκαλούν νόσο είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του μικροβιακού στελέχους και των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή (Baron, 1996; Γερμενής, 2000). Η ύπαρξη ανοσολογικού ελλείμματος του ξενιστή μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη λοίμωξης, ενώ αντίθετα, ανοσολογικά επαρκή άτομα μπορεί να εκδηλώσουν λοίμωξη εφόσον προσβληθούν από μικροβιακό στέλεχος με ορισμένους παράγοντες λοιμογονικότητας. Επιγραμματικά, οι παθογενετικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα Εντεροβακτηριακά για την πρόκληση λοιμώξεων βασίζονται κυρίως στις εξής λειτουργίες τους:

- i. Προσκόλληση και διεισδυτικότητα σε ιστούς και κύτταρα (αποικισμός)
- ii. Παραγωγή τοξινών
- iii. Ικανότητα διαφυγής από την άμυνα του ξενιστή

### **i. Προσκόλληση και διεισδυτικότητα σε ιστούς και κύτταρα (αποικισμός)**

Ειδικές επιφανειακές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας εξασφαλίζουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα του ξενιστή. Για παράδειγμα, πολλά Εντεροβακτηριακά φέρουν στην επιφάνειά τους ινίδια τύπου I (Type I fimbriae ή Pili), τα οποία δεσμεύονται από γλυκοπρωτεΐνες που φέρουν μαννόζη. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή (Χατζηδημητρίου, 2006).

### **ii. Παραγωγή τοξινών**

Τα περισσότερα Εντεροβακτηριακά παράγουν δύο ειδών τοξίνες, τις εξω- και τις ενδοτοξίνες. Οι εξωτοξίνες, των οποίων η παραγωγή ρυθμίζεται από την ύπαρξη πλασμιδίου, μεταφέρονται μέσω του αίματος και της λέμφου και ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση σε μακρινούς από το αρχικό σημείο μόλυνσης ιστούς. Αντίθετα, οι ενδοτοξίνες αποτελούν συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης του τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων. Τέτοιου είδους λοιμογόνος παράγων είναι και ο λιποπολυσακχαρίτης ή ενδοτοξίνη (LPS) (Raetz & Whitfield, 2002; Rietschel et al., 1994). Ο παράγων αυτός αποτελεί συστατικό της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης και είναι υπεύθυνος για πολλές από τις συστηματικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από Εντεροβακτηριακά, όπως ο πυρετός, η λευκοπενία, η λευκοκυττάρωση, η θρομβοπενία, το σηπτικό σοκ και ο θάνατος. Οι εξωτοξίνες και οι προστατευτικές δομές των βακτηρίων (π.χ. έλυτρο ή κάψα) είναι υπεύθυνες για την επιβίωση των μικροβίων στο περιβάλλον του ξενιστή.

### **iii. Ικανότητα διαφυγής από την άμυνα του ξενιστή**

Ορισμένα είδη Εντεροβακτηριακών επιβιώνουν ενδοκυτταρίως, ενώ άλλα παράγουν τοξικούς παραγόντες, όπως τις αιμολυσίνες και τις σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την ιστική βλάβη στον ξενιστή. Η βλάβη αυτή συχνά επιδεινώνεται και από την ανοσιακή απάντηση (φλεγμονώδης αντίδραση) του οργανισμού, η οποία ξεπερνά τα απαραίτητα για τον περιορισμό της λοίμωξης όρια. Η ικανότητα διαφυγής από την άμυνα του ξενιστή αφορά στα διάφορα στάδια της άμυνας (Σπυριδοπούλου, 2020; Χατζηδημητρίου, 2006). Κάθε παθογόνο έχει προσαρμοστεί ώστε να διαφεύγει ενός ή περισσότερων σταδίων. Ορισμένα βακτήρια διαθέτουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα συστατικά που εμποδίζουν την εγκόλπωση και φαγοκυττάρωσή τους, ενώ σημαντικό ρόλο



παίζει και η κάψα ορισμένων Εντεροβακτηριακών, η οποία είναι υδρόφιλη λόγω της πολυσακχαριδικής της σύνθεσης, με αποτέλεσμα να απωθεί την υδρόφοβη επιφάνεια των φαγοκυττάρων, εμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την φαγοκυττάρωσή τους. Επιπλέον, η κάψα ορισμένων βακτηρίων εμφανίζει χαμηλή αντιγονικότητα με συνέπεια τη μη παραγωγή ειδικών προς αυτή αντισωμάτων από τον ξενιστή και τη μη ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Ορισμένα βακτήρια επίσης, αλλάζουν περιοδικά την έκφραση των διαφόρων αντιγόνων με αποτέλεσμα τη διαφυγή από την εξουδετερωτική δράση των αντισωμάτων. Τέλος, ορισμένα Εντεροβακτηριακά έχουν τη δυνατότητα να καταστρέφουν τα κύτταρα του ξενιστή στα πλαίσια διαφυγής από την άμυνά του (Donnenberg, 2015).

## 1.6. Κλινικά σύνδρομα

Οι λοιμώξεις από Εντεροβακτηριακά οφείλονται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα σε 20-25 είδη, τα οποία προκαλούν λοιμώξεις κοινότητας ή σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις, ενώ το 50% περίπου των βακτηριαμιών φαίνεται να οφείλεται σε Εντεροβακτηριακά. Αποτελούν το 80% των κλινικά σημαντικών στελεχών, όσον αφορά τα Gram αρνητικά βακτήρια, και το 50% των κλινικά σημαντικών βακτηρίων που απομονώνονται στα μικροβιολογικά εργαστήρια (Wormser & Hanna, 2004). Τα κλινικά σύνδρομα που προκαλούν διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις εντερικές και εξωεντερικές λοιμώξεις.

Οι λοιμώξεις γαστρεντερικού προκαλούνται από τέσσερα κυρίως γένη Εντεροβακτηριακών: *Escherichia* (DuPont et al., 1971; Karmali, 1989), *Salmonella* (Karmali, 1989), *Shigella* (Edwards & Ewing, 1986) και *Yersinia* (Kandolo & Wauters, 1985), ενώ λιγότερο συχνά και χωρίς καλή τεκμηρίωση ενοχοποιούνται είδη *Citrobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella* κ.α. (Wadström et al., 1976).

Στις εξωεντερικές λοιμώξεις συμπεριλαμβάνονται οι λοιμώξεις αναπνευστικού, ουρολοιμώξεις (κυστίτιδα, πυελονεφρίτιδα, προστατίτιδα), επιμολύνσεις τραυμάτων, βακτηριαμίες και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (Schaberg, Culver, & Gaynes, 1991). Ειδικότερα, η σηψαιμία από Εντεροβακτηριακά στελέχη αποτελεί κατά κανόνα νοσοκομειακή κλινική οντότητα με καταστροφικές συνέπειες. Γι' αυτό απαιτείται η έγκαιρη κλινική υποψία και μικροβιολογική επιβεβαίωση με στόχο την ταχύτερη έναρξη κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής (Σπυριδοπούλου, 2020).

## 2. *Klebsiella* spp.

### 2.1. Χαρακτηριστικά, ταξινόμηση και επιδημιολογία

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* ανήκουν στα Gram αρνητικά βακτήρια, είναι λίγο μικρότερα από την *Escherichia Coli*, με μήκος 1-2 μm, φέρουν έλυτρο και ινίδια, είναι ακίνητα, αερόβια και δυνητικά αναερόβια. Το έλυτρο προσφέρει προστασία στο βακτήριο έναντι των φαγοκυττάρων, και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σε περιβάλλον θρεπτικών υλικών πλούσιων σε υδατάνθρακες, όπου τα βακτήρια σχηματίζουν βλεννώδεις αποικίες. Οι οργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 12 και 43 °C (βέλτιστη στους 37°C) και καταστρέφονται στους 55 °C για 30 λεπτά. Είναι ικανοί να επιβιώσουν σε συνθήκες ξηρασίας για μήνες, ενώ οι καλλιέργειες παραμένουν βιώσιμες για πολλές εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου (Podschun & Ullmann, 1998; Κουπίδου, 2019).

Βάσει της τρέχουσας ταξινόμησης ("NCBI taxonomy,"), το γένος *Klebsiella* χωρίζεται στα ακόλουθα βασικά είδη: *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella variicola* και *Klebsiella planticola*.

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* παρουσιάζουν αντίστοιχες με τα υπόλοιπα Εντεροβακτηριακά βιοχημικές ιδιότητες, δηλαδή ζυμώνουν τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, ανάγουν τα νιτρικά, παράγουν καταλάση, αλλά όχι οξειδάση και είναι θετικά στο Voges-Proskauer τεστ. Το σημαντικότερο κλινικά μέλος του γένους *Klebsiella* είναι η *Klebsiella pneumoniae* (Greenwood, Slack, Peutherer, & Barer, 2010), το οποίο προκαλεί το 75% έως 86% των κλινικών λοιμώξεων από *Klebsiella* (Broberg, Palacios, & Miller, 2014) και χωρίζεται σε τρία υποείδη (Gorbach, Bartlett, & Blacklow, 1992): *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ssp. rhinoscleromatis* και *Klebsiella pneumoniae ssp. ozaenae*.

Διάφορα είδη *Klebsiella* απομονώνονται συχνά από ποικίλες περιβαλλοντικές πηγές, όπως το έδαφος και το νερό (Niemelä & Väättänen, 1982; Sjogren & Gibson, 1981), ενώ έχουν απομονωθεί και σε υδατικά περιβάλλοντα (Caplenas, Kanarek, & Dufour, 1981), δέντρα, φρέσκα λαχανικά και τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οξέα (Duncan & Razzell, 1972). Επιπλέον, ανευρίσκονται σε διάφορα θηλαστικά (Gordon & FitzGibbon, 1999) ως μέρος της φυσιολογικής τους χλωρίδας (Σπυριδοπούλου, 2020). Τα λαχανικά και τρόφιμα ζωικής προέλευσης στα οποία απομονώνεται *K.pneumoniae*, μπορεί κατ' αυτό τον τρόπο να αποτελούν μια πιθανή δεξαμενή για νοσοκομειακή διασπορά (Brown

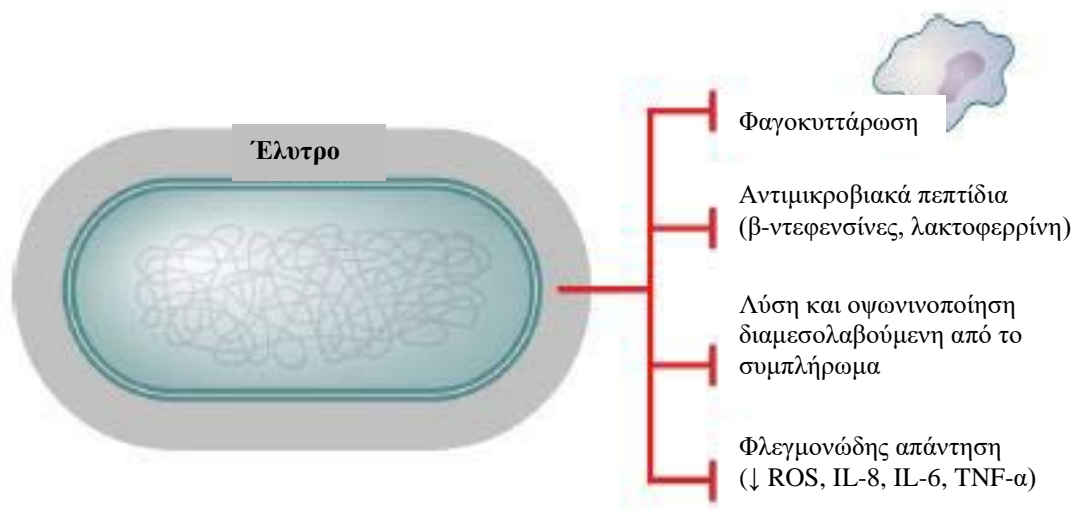
& Seidler, 1973). Το βακτήριο έτσι διαδίδεται μέσα από νέες οδούς, όπως η σύγχρονη τροφική αλυσίδα (G. S. Davis et al., 2015; Κουπίδου, 2019).

Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τον άνθρωπο, η *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του στόματος, του δέρματος και του εντέρου. Επιπλέον, μπορεί να ανιχνευθεί ως σαπρόφυτο στο φάρυγγα, το γαστρεντερικό σύστημα και τα χέρια του προσωπικού των νοσοκομείων (Podschun & Ullmann, 1998; Κουπίδου, 2019; Σπυριδοπούλου, 2020). Από έρευνες προσδιορισμού φορέας σε κατοίκους αστικών περιοχών (μη σχετιζόμενων με νοσοκομειακό περιβάλλον), σε προσωπικό νοσοκομείων και σε πρόσφατα εισαχθέντες ασθενείς, το ποσοστό ανέρχεται σε 30-37%, ενώ υψηλά ποσοστά αποικισμού καταγράφονται και σε επαγγελματίες υγείας καθώς και σε ασθενείς σε παρατεταμένη νοσηλεία, όπου το ποσοστό φτάνει το 43% (Cooke, Brayson, Edmondson, & Hall, 1979; T. J. Davis & Matsen, 1974).

Ο μικροοργανισμός αναγνωρίζεται παγκοσμίως ως ευκαιριακό παθογόνο σε ενδοноσοκομειακούς ασθενείς. Είναι υπεύθυνος επίσης για λοιμώξεις του ουροποιητικού, του αναπνευστικού, καθώς και για λοιμώξεις μαλακών μορίων και επιμολύνσεις τραυμάτων. Επιπλέον, έχει συσχετισθεί με λοιμώξεις σχετιζόμενες με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες και με θανατηφόρες μικροβιαίμιες (Podschun & Ullmann, 1998). Οι λοιμώξεις από *K. pneumoniae* παρατηρούνται πρωτίστως σε ανοσοκατεσταλμένους νοσηλευόμενους ασθενείς με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα, όπως σακχαρώδη διαβήτη, χρόνιες αποφρακτικές πνευμονικές παθήσεις, παθήσεις του ήπατος, κακοήθειες υπό χημειοθεραπευτική αγωγή, νεφρική ανεπάρκεια, ασθενείς σε θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή αλλά και πρόωρα νεογνά, νοσηλευόμενα σε Μονάδες Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών. Παράγοντες που προδιαθέτουν σε λοιμώξεις από *K. pneumoniae* περιλαμβάνουν τη μεγάλη ηλικία, το χρόνιο αλκοολισμό, το διαβήτη, χρόνιες καρδιολογικές, νεφρικές και αναπνευστικές παθήσεις και νεοπλασματικές νόσους (Hansen, Gottschau, & Kolmos, 1998). Η *K. pneumoniae* είναι φύσει ανθεκτική σε πολλά αντιβιοτικά, ενώ αποκτά εύκολα αντοχή σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια (Greenwood et al., 2010). Η εξαιρετική ικανότητα και ταχύτητα μετάδοσης του μικροοργανισμού οφείλεται κατά βάση στην απόκτηση γονιδίων αντοχής μέσω πλασμιδίων και οδηγεί συχνά σε νοσοκομειακές επιδημίες με υψηλά ποσοστά θνητότητας (Pavan Kumar, Mohan, Rakesh, Prasad, & Joseph, 2017; Podschun & Ullmann, 1998).

## 2.2. Αντιγονική δομή

Τα κυριότερα αντιγόνα της *Klebsiella pneumoniae* είναι το σωματικό O και το αντιγόνο K του ελύτρου. Το έλυτρο (κάψα) ενισχύει τη λοιμογόνο δύναμη του μικροοργανισμού, δεδομένου ότι αποτρέπει τη φαγοκυττάρωσή του από κύτταρα του ανοσοποιητικού, εμποδίζει τη δράση μικροβιοκτόνων πεπτιδίων, αναστέλλει τη δράση συστατικών του συμπληρώματος (κλάσμα C3) που προωθούν τη λύση του βακτηρίου και αποτρέπει την φλεγμονώδη απάντηση μέσω αναστολής παραγωγής μορφών οξυγόνου, IL-8, IL-6 και TNF- $\alpha$  (Paczosa & Mecsas, 2016; Κουπίδου, 2019). Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 80 καψιδικά αντιγόνα, τα οποία απαντούν σε διάφορους συνδυασμούς με πέντε διαφορετικά σωματικά αντιγόνα (O). Φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της αντιγονικής δομής και της οικολογικής θέσης των βακτηρίων. Παραδείγματος χάριν, στο αναπνευστικό σύστημα παρουσιάζονται κυρίως μέλη με καψιδικούς οροτύπους 1-6 (Brisse, Issenhuth-Jeanjean, & Grimont, 2004; Greenwood et al., 2010; Podschun & Ullmann, 1998).



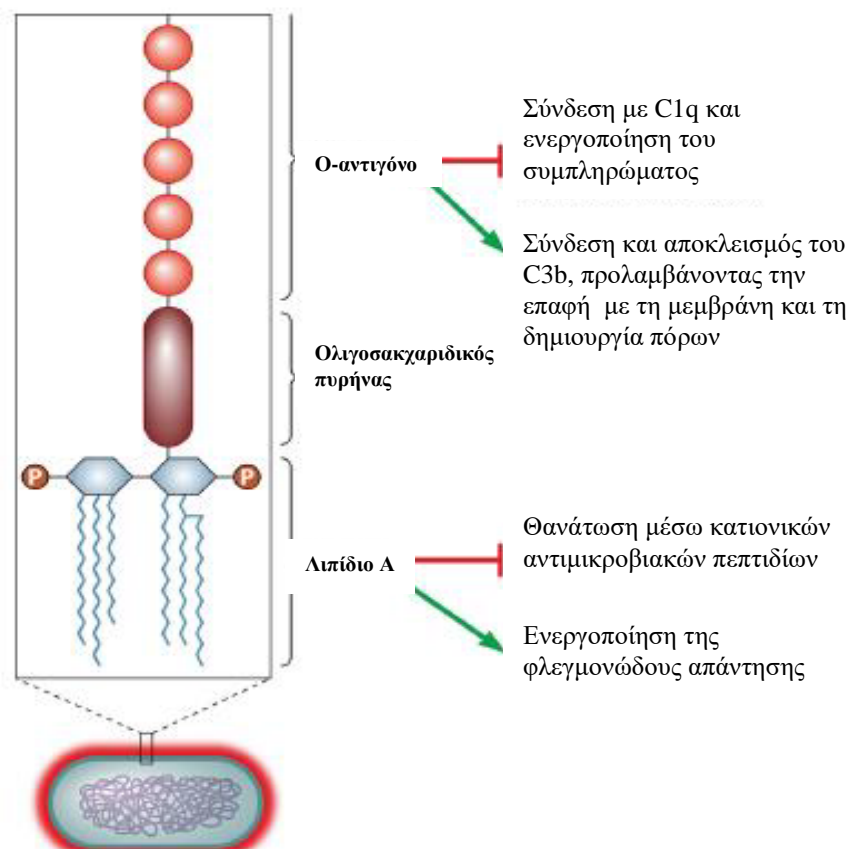
**Εικόνα 1:** Ο ρόλος του ελύτρου στην λοιμογόνο δράση της *K.pneumoniae*. Προσαρμογή από (Paczosa & Mecsas, 2016)

### 2.3. Παθογενετικοί μηχανισμοί

Η ικανότητα πρόκλησης νόσου που παρουσιάζουν τα παθογόνα μικρόβια διευκολύνεται από ορισμένα στοιχεία, τους παράγοντες λοιμογονικότητας (ή αγκρεσίνες). Οι παράγοντες αυτοί κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικό DNA, πλασμίδια, βακτηριοφάγους και μεταθετά στοιχεία. Βασικές διαδικασίες για την εγκατάσταση της λοίμωξης αποτελούν τα εξής βήματα: ο αποικισμός κάποιας ανατομικής θέσης, η διείσδυση στους ιστούς, ο ακόλουθος πολλαπλασιασμός με αποφυγή των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή και η πρόκληση βλάβης (Finlay & Falkow, 1997; Σπυριδοπούλου, 2020). Η *K.pneumoniae* κινητοποιεί πολλές στρατηγικές προστασίας από την ανοσιακή απάντηση του ξενιστή. Τα κύρια συστατικά παθογονικότητας της είναι τα ακόλουθα τέσσερα: 1) οι προσκολλητίνες, 2) τα καψιδικά αντιγόνα, 3) οι λιποπολυσακχαρίτες και 4) τα σιδηροφόρα (Podschun & Ullmann, 1998).

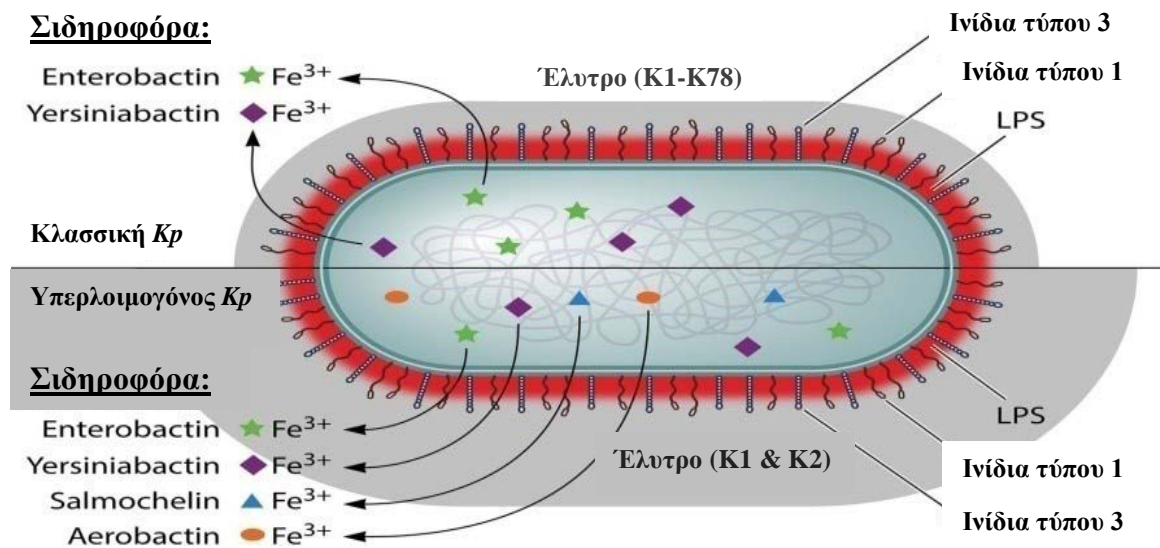
- **Προσκολλητίνες (adhesins):** Οι προσκολλητίνες είναι συστατικά της επιφάνειας των βακτηρίων, τα οποία διευκολύνουν την προσκόλληση σε άλλα κύτταρα ή επιφάνειες, βασικό βήμα για την επίτευξη του αποικισμού και της λοίμωξης. Η προσκόλληση πραγματοποιείται μέσω επιφανειακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και συνδετών της βακτηριακής επιφάνειας και είναι ειδική. Οι προσκολλητίνες μπορεί να είναι και αιμοσυγκολλητίνες και συχνά εδράζονται σε κροσσούς (ινίδια, fimbriae ή pili). Οι κροσσοί ή ινίδια είναι λεπτές προεκτάσεις της βακτηριακής επιφάνειας που χρησιμεύουν στην προσκόλληση του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού, αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος του ξενιστή (Παναγιωτακοπούλου, 2013). Τα παχιά ινίδια τύπου 1 (type 1 fimbriae) εκφράζονται από την πλειοψηφία των στελεχών *K.pneumoniae* που απομονώνονται κλινικά (Podschun & Sahly, 1991) και βοηθούν στη σύνδεση με ουροεπιθηλιακά κύτταρα. Έτσι συμμετέχουν στην παθογένεια λοιμώξεων του κατώτερου και ανώτερου ουροποιητικού (Fader & Davis, 1982). Επιπλέον, τα ινίδια τύπου-3 συμμετέχουν στη διαδικασία του σχηματισμού βιομεμβράνης, μέσω του οποίου αποικίζονται οι ιατρικές συσκευές (Di Martino, Cafferini, Joly, & Darfeuille-Michaud, 2003).

- Καψιδικά αντιγόνα:** Το έλυτρο αποτελεί ένα παχύ περίβλημα από υδρόφιλους πολυσακχαρίτες, που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες τεσσάρων έως έξι σακχάρων. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 77 διακριτοί εξωπολυσακχαρίτες, οι οποίοι συνιστούν τα καψιδικά αντιγόνα (αντιγόνα K) και παρουσιάζουν διαβάθμιση στη μολυσματικότητά τους ανάλογα με το ποσοστό μαννόζης του καψιδικού πολυσακχαρίτη. Τα αντιγόνα K παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της οψωνινοποίησης και φαγοκυττάρωσης, αποκλείοντας την εναπόθεση ή ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Podschun & Ullmann, 1992; Williams, Lambert, Brown, & Jones, 1983). Οι περισσότεροι λοιμογόνιοι ορότυποι είναι οι K1 και K2, ενώ οι συχνότερα απομονούμενοι οι K1, K2, K21 (Podschun, Heineken, Ullmann, & Sonntag, 1986).
- Λιποπολυσακχαρίτες:** Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), γνωστός και ως ενδοτοξίνη, είναι απαραίτητο συστατικό του εξωτερικού περιβλήματος των Gram αρνητικών βακτηρίων. Αποτελείται από το O αντιγόνο, τον κεντρικό ολιγοσακχαριδικό πυρήνα και το λιπίδιο A (εικόνα 2). Αντίθετα με τα 77 διαφορετικά καψιδικά αντιγόνα της *K.pneumoniae*, έχουν ταυτοποιηθεί μόνο 9 διαφορετικά O-αντιγόνα, με το O1 να είναι το πιο κοινό (Paczosa & Mecsas, 2016). Ο βασικός ρόλος του O-αντιγόνου είναι η προστασία από τη διαμεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα βακτηριοκτόνο δράση του ορού (Merino, Camprubí, Albertí, Benedí, & Tomás, 1992). Ο λιποπολυσακχαρίτης αποτελεί τόσο πλεονέκτημα όσο και τροχοπέδη για την *K.pneumoniae* κατά τη διάρκεια λοίμωξης. Είναι σημαντικός παράγων λοιμογονικότητας που προστατεύει το βακτήριο από τη χυμική άμυνα, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και έναν ισχυρό ενεργοποιητή του ανοσοποιητικού. Η λοιμογόνος δράση του βασίζεται στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω της εναλλακτικής οδού, στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων, με επακόλουθη παραγωγή κυτταροκινών, όπως TNF-α, IL-1 και IL-6, ενεργοποίηση και άλλων κυττάρων και έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (Merino et al., 1992; Paczosa & Mecsas, 2016; Αρσένη, 1994c; Σπυριδοπούλου, 2020).



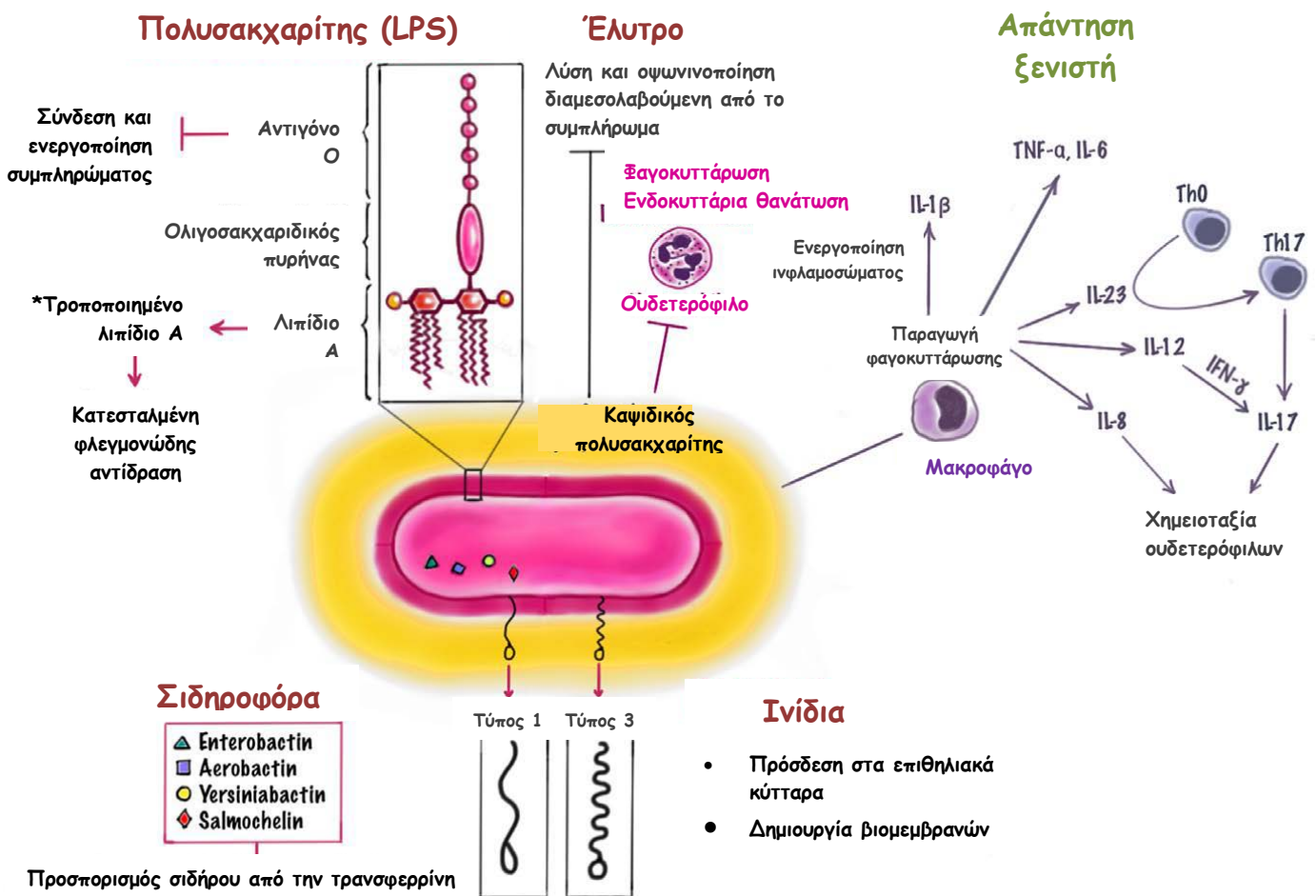
**Εικόνα 2:** Δομή και ρόλος του LPS στη λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae*. Προσαρμογή από (Paczosa & Meccas, 2016)

- Σιδηροφόρα:** Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την *K.pneumoniae* κατά τη διάρκεια λοίμωξης. Τα σιδηροφόρα αποτελούν χηλικούς παράγοντες, οι οποίοι εκκρίνονται από τα βακτήρια με στόχο τη δέσμευση των απαραίτητων για τη λειτουργία τους ιόντων σιδήρου από τις σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες του ξενιστή (Παναγιωτακοπούλου, 2013). Τα συχνότερα σιδηροφόρα της *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 (Miethke & Marahiel, 2007).



**Εικόνα 3:** «Τέσσερις καλά χαρακτηρισμένοι παράγοντες λοιμογονικότητας σε κλασικά και υπερλοιμογόνα στελέχη *K.pneumoniae*». (Paczosa & Mecsas, 2016; Κουπίδου, 2019)





**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων λοιμογονικότητας της *K.pneumoniae* και της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Οι καψιδικοί πολυσακχαρίτες προλαμβάνουν τη φαγοκυττάρωση και σταματούν τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα λύση και οψωνινοποίηση. Ο ανέπαφος LPS προκαλεί ισχυρή φλεγμονώδη απάντηση και προλαμβάνει την πρόσδεση του C1q στο βακτήριο και την ακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού του συμπληρώματος. Ορισμένα στελέχη μπορούν να προσαρμόσουν τον LPS, καθιστώντας τον μη αναγνωρίσιμο από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενώ άλλα μπορούν να χρησιμοποιήσουν την κάψα ώστε να προλάβουν την αναγνώριση του LPS από τους toll-like (TLR4) υποδοχείς.

Η *K.pneumoniae* φέρει ινίδια τύπου 1 και 3, τα οποία διαμεσολαβούν την προσκόλληση σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες, διευκολύνοντας την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα και τη δημιουργία βιομεμβρανών. Επιπλέον, συνθέτει σιδηροφόρα (enterobactin, aerobactin, yersiniabactin και salmochelin) για να προσποριστεί σίδηρο από τον ξενιστή.

Το σύστημα των μονοκυττάρων/μακροφάγων παίζει κεντρικό ρόλο στη μη ειδική ανοσολογική απάντηση, μέσω της φαγοκυττάρωσης και της παραγωγής μεσολαβητών, όπως οι κυτοκίνες και οι χημειοκίνες. Σημαντικός μεσολαβητής στη διαδικασία είναι η IL-23, η οποία κινητοποιεί την παραγωγή IL-17, που μαζί με την IL-8 προωθεί τη στρατολόγηση των ουδετερόφιλων. Η έκφραση της IL-17 ενισχύεται επίσης από την IL-12, μέσω της IFN-γ. Άλλες σημαντικές κυτοκίνες είναι η IL-1β, η οποία παράγεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του NOD-like receptor pyrin domain-containing (NLRP3) ινφλαμοσώματος, και άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α και η IL-6. Η κάθετη γραμμή (—|) υποδηλώνει αναστολή. Προσαρμογή από Paczosa and Mecsas (Paczosa & Mecsas, 2016). IFN-γ, ιντερφερόνη-γ. (Piperaki, Syrogiannopoulos, Tzouveleki, & Daikos, 2017)

## 2.4. Λοιμώξεις από *K.pneumoniae*

Η *K.pneumoniae* προκαλεί λοιμώξεις τόσο στην κοινότητα όσο και σε νοσηλευόμενους ασθενείς. Έχει συσχετισθεί με την πρόκληση σοβαρής βρογχοπνευμονίας με σχηματισμό αποστημάτων στους πνεύμονες (πνευμονία Friedländer) (Carpenter, 1990; Paganin et al., 2004), στην οποία, παρότι εμφανίζει ομοιότητες με την πνευμονιοκοκκική πνευμονία, η νέκρωση του πνευμονικού παρεγχύματος είναι πιο εκτεταμένη. Τα σποραδικά αυτά κρούσματα πνευμονίας αφορούν κυρίως αλκοολικούς και ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Η συνοδός βακτηριαμία εμφανίζει υψηλά ποσοστά θνητότητας και σχετίζεται κυρίως με τον καψιδικό τύπο K1. Πέραν της πνευμονίας, η *K.pneumoniae* έχει συσχετισθεί με λοιμώξεις του ουροποιητικού με παρόμοια χαρακτηριστικά με τις ουρολοιμώξεις από άλλα ουροπαθογόνα, αλλά και με πυογόνα αποστήματα ήπατος (Broberg et al., 2014; Greenwood et al., 2010). Ως νοσοκομειακό παθογόνο είναι υπεύθυνη για σηπτικές λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων, λοιμώξεις του ουροποιητικού, των χοληφόρων οδών, για μηνιγγίτιδα και ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις σχετιζόμενες με καθετήρες και βακτηριαμία (G. L. Daikos, Markogiannakis, Souli, & Tzouveleki, 2012).

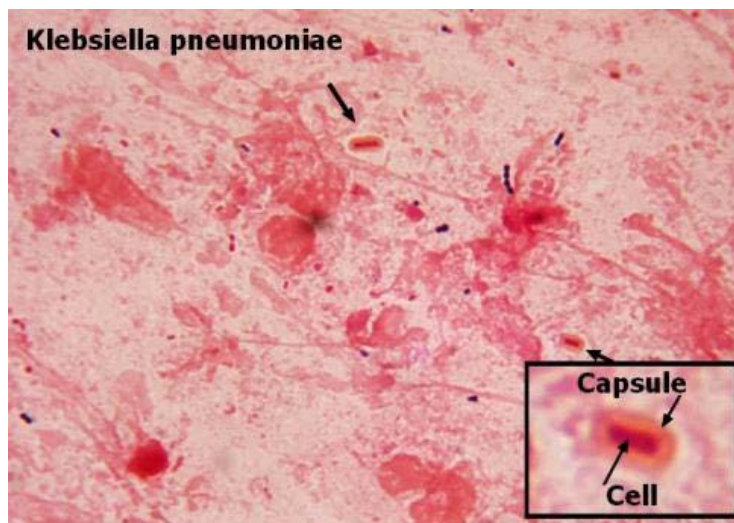
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αποτελεί ο αποικισμός του γαστρεντερικού ή αναπνευστικού συστήματος των νοσηλευόμενων ασθενών, πολλές φορές από ανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες στελέχη *K.pneumoniae*. Σημαντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες αποικισμού φαίνεται ότι είναι η ευρεία χρήση αντιβιοτικών και η παρατεταμένη νοσηλεία, ενώ ο αποικισμός οδηγεί σε νοσοκομειακές λοιμώξεις, συχνά με υψηλή θνητότητα, καθώς και σε υψηλό βαθμό ενδονοσοκομειακής μεταφοράς του βακτηρίου μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών (M. Papadimitriou-Olivgeris et al., 2012; M. J. Schwaber & Carmeli, 2008).

Τα τελευταία χρόνια, ανησυχητική εξέλιξη έχει αποτελέσει η εμφάνιση μιας νέας υπερλοιμογόνου ποικιλίας της *K.pneumoniae*, της hvKP (hypervirulent *K.pneumoniae*), η οποία αναγνωρίζεται όλο και συχνότερα στις δυτικές χώρες και αποτελεί σημαντική απειλή. Έχει συσχετισθεί με διεισδυτικές λοιμώξεις, όπως ηπατικά αποστήματα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα και ενδοφθαλμίτιδα σε υγιείς και ανοσοκατεσταλμένους. Παρουσιάζει σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα και σε άτομα χωρίς υποκείμενα νοσήματα. Το στοιχείο το οποίο την καθιστά τόσο λοιμογόνο είναι η ικανότητά της να δεσμεύει αποτελεσματικότερα το σίδηρο και να εκφράζει πολυσακχαριδική κάψα με υπερπαραγωγή βλέννης. Τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ικανότητα διασποράς και

εμφανίζουν, ομοίως με την κλασσική *K.pneumoniae*, πολυανθεκτικά στελέχη μέσω της απόκτησης γονιδίων αντοχής (T. A. Russo & Marr, 2019). Τα στελέχη hνKP φαίνεται ότι είναι ικανά να παράγουν πιο συχνά από τα κλασσικά στελέχη biofilms (βιομεμβράνες), γεγονός που συνεισφέρει στην αυξημένη λοιμογόνο δράση τους (Shon, Bajwa, & Russo, 2013; M.-C. Wu, Lin, Hsieh, Yang, & Wang, 2011; Κουπίδου, 2019).

## 2.5. Διάγνωση

Η διάγνωση της λοίμωξης από *K.pneumoniae* γίνεται με συλλογή δειγμάτων αίματος, ούρων, άκρων αγγειακών γραμμών, αναπνευστικών εκκρίσεων, υλικού τραυμάτων και αποστημάτων και άλλων υλικών. Για την ανίχνευση της *K.pneumoniae* χρησιμοποιούνται συμβατικές μέθοδοι, όπως η μικροσκόπηση, η καλλιέργεια δειγμάτων, η βιοχημική ταυτοποίηση με εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια και αυτοματοποιημένα συστήματα, όπως το σύστημα VITEK. Στη μικροσκοπική εξέταση η *Klebsiella* παρουσιάζεται ως κοντό, σχετικά παχύ Gram αρνητικό βακτηρίδιο που συχνά περιβάλλεται από έλυτρο.



Εικόνα 5: *K.pneumoniae* σε Gram χρώση (Σπυριδοπούλου, 2020)

Η ταυτοποίηση της *Klebsiella* πραγματοποιείται και με φαινοτυπικές μεθόδους, καθώς αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα στα συνήθη θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των Εντεροβακτηριακών (θρεπτικό άγαρ, αιματούχο άγαρ), αλλά και σε διαφοροποιητικά μέσα όπως το MacConkey agar και το eosin-methylene blue agar (EMB) (Σπυριδοπούλου, 2020).



**Εικόνα 6:** *K. pneumoniae* σε MacConkey agar (Σπυριδοπούλου, 2020)

Πέραν των ανωτέρω μεθόδων η ταυτοποίηση της *Klebsiella* μπορεί να επιτευχθεί με μοριακές μεθόδους, όπως η PCR, τεχνικές με βάση τον υβριδισμό, μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays) και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) (Al-Zahrani, 2018).

### 3. Μικροβιακή αντοχή

#### 3.1. Ορισμός

Η μικροβιακή αντοχή σε μικροβιολογικό επίπεδο ορίζεται ως η ικανότητα ενός βακτηριακού στελέχους να επιβιώνει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη του ίδιου είδους, ενώ στην κλινική πράξη εκφράζει την ικανότητα ενός στελέχους να επιβιώνει της αντιμικροβιακής θεραπείας. Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι ενδογενής (intrinsic), χαρακτηριστική του βακτηριακού είδους, ή επίκτητη (acquired) και μπορεί να οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του γενετικού υλικού ή απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλα μικροβιακά στελέχη (Magiorakos et al., 2012). Παράδειγμα ενδογενούς αντοχής αποτελούν τα Εντεροβακτηριακά, τα οποία είναι ανθεκτικά στη βανκομυκίνη λόγω της αδυναμίας του συγκεκριμένου αντιβιοτικού να εισχωρήσει στην εξωτερική τους μεμβράνη εξαιτίας του μεγάλου μοριακού του βάρους. Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα ενδογενούς αντοχής αποτελεί η *Klebsiella*, η οποία μέσω της παραγωγής β-λακταμασών είναι ανθεκτική στην αμπικιλίνη. Αντίστοιχα, οι *Salmonella* και *Shigella* είναι ανθεκτικές στις κεφαλοσπορίνες 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς και τις αμινογλυκοσίδες, το *Enterobacter* στην αμπικιλίνη, κεφαλοθίνη, αμοξυκιλλίνη-κλαβουλανικό, η *Serratia* στα νιτροφουράνια και ο *Proteus* στις τετρακυκλίνες, κολιστίνη και νιτροφουράνια (Χατζηδημητρίου, 2006).

Ανάλογα με το βαθμό αντοχής τους στα αντιμικροβιακά φάρμακα τα μικρόβια διακρίνονται σε πολυανθεκτικά (Multi Drug Resistant, MDR), εξαιρετικά πολυανθεκτικά (Extremely Drug Resistant, XDR) και πανανθεκτικά (Pandrug Resistant, PDR). Στην πρώτη κατηγορία των πολυανθεκτικών ανήκουν μικρόβια ανθεκτικά σε τουλάχιστον έναν παράγοντα τριών ή περισσότερων κατηγοριών αντιμικροβιακών. Στα εξαιρετικά πολυανθεκτικά ανήκουν μικρόβια που εμφανίζουν αντοχή σε τουλάχιστον έναν παράγοντα σε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών πλην μίας ή δύο. Τέλος, πανανθεκτικά ονομάζονται μικρόβια τα οποία είναι ανθεκτικά σε όλα τα κυκλοφορούντα αντιμικροβιακά.

Η μικροβιακή αντοχή είναι φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο, συνέπεια της φυσικής επιλογής. Τα βακτήρια, όπως όλοι οι ζώντες οργανισμοί, έχουν την ικανότητα προσαρμογής σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Ιστορικά αποδεικνύεται ότι είχαν την ικανότητα παραγωγής και αδρανοποίησης αντιβιοτικών δισεκατομμύρια χρόνια πριν, χαρακτηριστικό αναμενόμενο, αν αναλογιστεί κανείς τα δισεκατομμύρια χρόνια κατά τα οποία αποικίζουν αυτό τον πλανήτη (Hall & Barlow, 2004). Κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού των βακτηριδίων μπορούν να δημιουργηθούν σημειακές μεταλλάξεις στο γενετικό τους υλικό.

Αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν φυσιολογικά, ωστόσο δεν έχουν πλεονέκτημα επιβίωσης, εκτός εάν τα βακτήρια τοποθετηθούν σε περιβάλλον πίεσης επιλογής (selective pressure). Η έκθεση ενός βακτηριακού κλώνου που έχει υποστεί μετάλλαξη που το καθιστά ανθεκτικό σε ένα αντιβιοτικό, στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, του επιτρέπει να αναπτυχθεί εις βάρος βακτηρίων που δεν έχουν τη μετάλλαξη και ως εκ τούτου, πεθαίνουν. Ελλείψει ανταγωνισμού για τις θρεπτικές ουσίες, το ανθεκτικό στέλεχος γίνεται πλέον μέρος της βακτηριακής χλωρίδας (Southwick, 2008). Η ισορροπία του φυσιολογικού αυτού φαινομένου διαταράσσεται σε ανησυχητικό βαθμό από την υπέρμετρη και μη ενδεδειγμένη χρήση αντιβιοτικών που παρατηρείται στις μέρες μας.

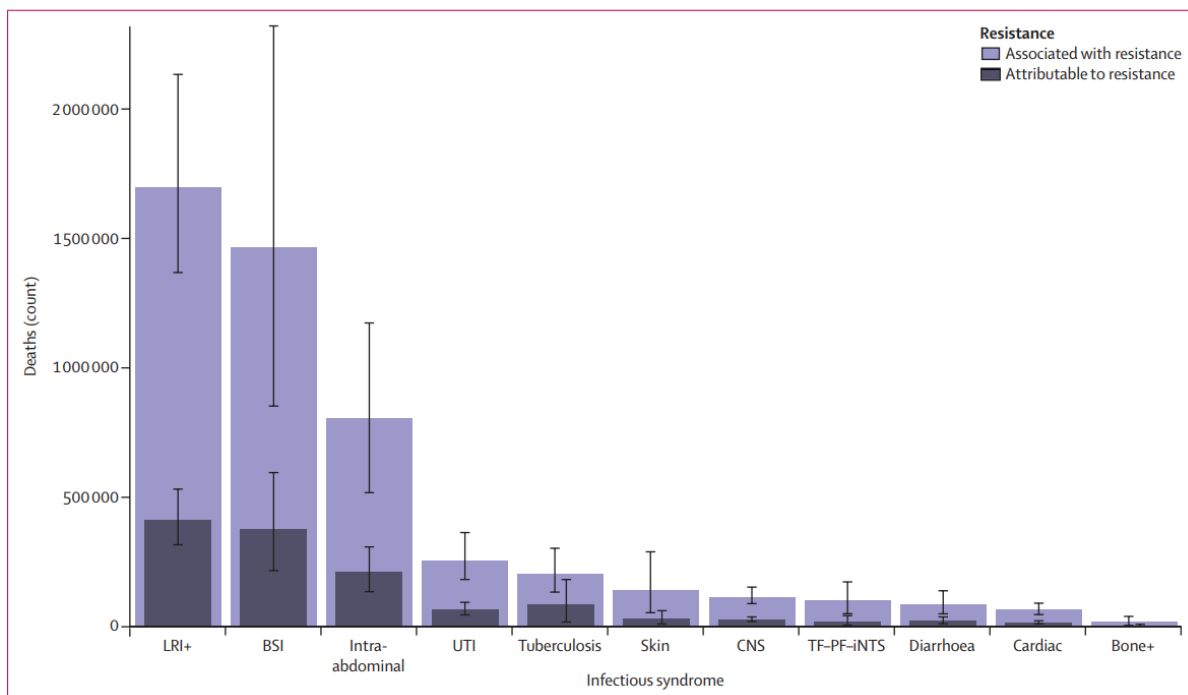
### 3.2. Έκταση του προβλήματος

Ήδη από την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού είχε υποστηριχθεί από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ η ανάγκη προσεκτικής και φειδωλής χρήσης του, λόγω του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών (Fleming, 1945). Από τις πρώτες δεκαετίες χρήσης αντιβιοτικών παρατηρήθηκε το φαινόμενο της αντοχής, ωστόσο κατά την τελευταία 20ετία η παγκόσμια εξάπλωση και ο βαθμός επίτασής του το καθιστούν βασικό κίνδυνο δημόσιας υγείας, τόσο για τα χρόνια που διανύουμε όσο και για μελλοντικές γενιές. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για τη δημόσια υγεία, ενώ το πρόβλημα είναι τέτοιο που στο μέλλον αναμένεται να αναφερόμαστε σε μία εποχή «Μετά-αντιβιοτική» (post-antibiotic era).

Τόσο η αυξανόμενη χρήση αντιβιοτικών (antibiotic overuse), όσο και η ακατάλληλη χρήση τους (antibiotic misuse) κατά το 2<sup>ο</sup> μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα έχει οδηγήσει σε επίταση του φαινομένου της πίεσης επιλογής σε ευαίσθητα βακτήρια και έχει ευοδώσει την επιβίωση και πολλαπλασιασμό ανθεκτικών στελεχών, όπως αποδεικνύεται και από μελέτες διερεύνησης της σχέσης μεταξύ κατανάλωσης αντιβιοτικών και ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών (Arason et al., 2002; Bell, Schellevis, Stobberingh, Goossens, & Pringle, 2014). Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση τους στη ζωική και φυτική παραγωγή, η ελλιπής διαχείριση ανθρώπινων και ζωικών λυμάτων, στα οποία μπορεί να περιέχονται αντιβιοτικά και απολυμαντικά, τα ανεπαρκή μέτρα ελέγχου λοιμώξεων, αλλά και η αύξηση της συχνότητας μετανάστευσης των ανθρώπων και ο συγχρωτισμός σε μέρη με ανεπαρκή ύδρευση και αποχέτευση έχουν συντελέσει στην επίταση του φαινομένου (MacPherson et al., 2009; Γριβάκου, 2018).

Ταυτόχρονα, η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στη θεραπεία των λοιμώξεων φθίνει εξαιτίας της εμφάνισης των πολυανθεκτικών στελεχών (Lushniak, 2014). Έτσι, ο κίνδυνος μετάβασης σε μία μετα-αντιβιοτική εποχή (post-antibiotic era) γίνεται όλο και μεγαλύτερος. Ελλείψει ανάπτυξης αντιβιοτικών νέας γενιάς, η σωστή χρήση των ήδη υπαρχόντων είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων (Albrich, Monnet, & Harbarth, 2004).

Οι λοιμώξεις συνεχίζουν να αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, μετά την ισχαιμική καρδιακή νόσο, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και τη χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια, παρά τα επιτεύγματα της επιστήμης, όπως η αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία, η ανοσοποίηση, η αντισηψία και απολύμανση και οι διαγνωστικές τεχνικές (World Health Organization, 2020). Παρότι κατά το δεύτερο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα παρατηρήθηκε στις ΗΠΑ μία σημαντική μείωση της θνητότητας από λοιμώξεις χάρις στα ανωτέρω επιτεύγματα, από το 1985 και έπειτα άρχισε να παρατηρείται αυξητική τάση στους θανάτους από λοιμώξεις, κυρίως λόγω του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής (Karen Bush et al., 2011; Michael, Dominey-Howes, & Labbate, 2014). Όπως γίνεται φανερό, η απώλεια της αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών λόγω της μικροβιακής αντοχής συνιστά σημαντική τροχοπέδη στη μάχη ενάντια στα λοιμώδη νοσήματα και στην περαιτέρω επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης. Πέραν του μεγάλου αριθμού θανάτων που αναμένονται εξαιτίας της επιδημίας των πολυανθεκτικών μικροβίων, σημαντική είναι και η οικονομική επιβάρυνση των κρατών, δεδομένου ότι η θεραπεία μίας ανθεκτικής λοίμωξης είναι πολύ περισσότερο δαπανηρή. Έτσι, υπολογίζεται ότι το έτος 2050, οι θάνατοι που θα οφείλονται σε λοιμώξεις από ανθεκτικά στελέχη θα ανέρχονται σε 10.000.000/έτος με κόστος που θα υπερβαίνει τα 100 τρισεκατομμύρια δολάρια. Υπολογίζεται δηλαδή ότι λοιμώξεις από ανθεκτικά μικρόβια θα κοστίζουν τη ζωή σε 20 ανθρώπους ανά λεπτό (O'Neill, 2016; Γριβάκου, 2018). Στην **εικόνα 7** φαίνεται το πλήθος των θανάτων παγκοσμίως που σχετίζονται με τη μικροβιακή αντοχή και των θανάτων που αποδίδονται στην αντοχή ανά λοιμώδες σύνδρομο.

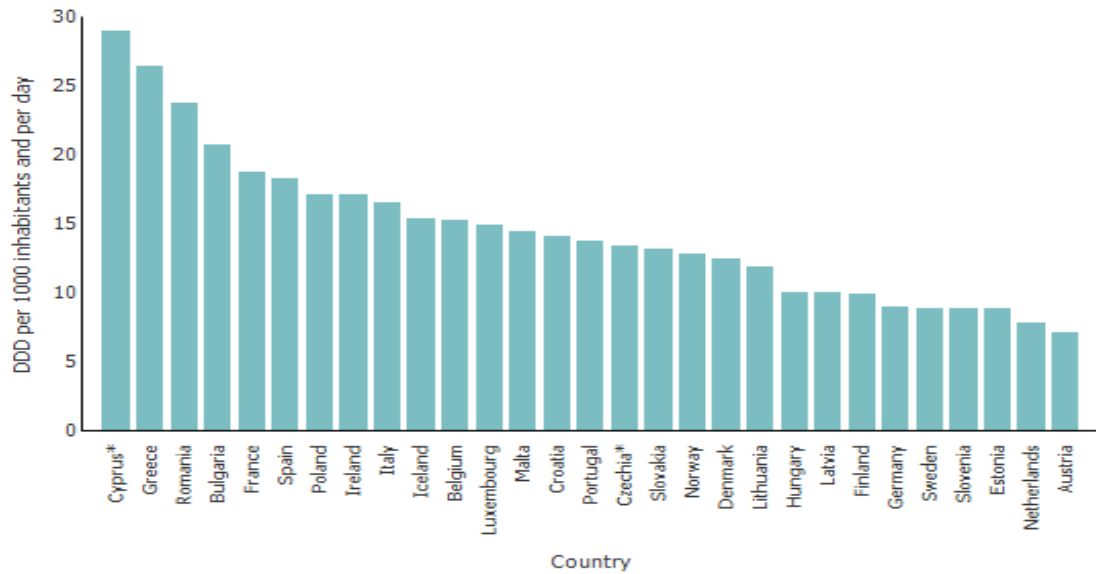


**Εικόνα 7.** Θάνατοι που αποδίδονται στη μικροβιακή αντοχή παγκοσμίως και θάνατοι που σχετίζονται με την αντοχή, ανάλογα με το λοιμώδες σύνδρομο, 2019. Οι ράβδοι σφαλμάτων δείχνουν τα 95% διαστήματα αβεβαιότητας. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα χλαμύδια και η γονόρροια. Bone+=Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων. BSI=Βακτηραιμίες. Cardiac=ενδοκαρδίτιδα και άλλες λοιμώξεις της καρδιάς. CNS=μηνιγγίτιδα και άλλες λοιμώξεις ΚΝΣ. Intra-abdominal=περιτονίτιδα και ενδοκοιλιακές λοιμώξεις. LRI+=Λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού και όλες οι σχετιζόμενες λοιμώξεις του θώρακα. Skin=βακτηριακές λοιμώξεις του δέρματος και υποδόριου ιστού. TF-PF-iNTS= τυφοειδής πυρετός, παρατυφοειδής πυρετός και διεισδυτική μη-τυφική *Salmonella* spp. UTI=λοιμώξεις ουροποιητικού. (C. J. Murray et al., 2022)

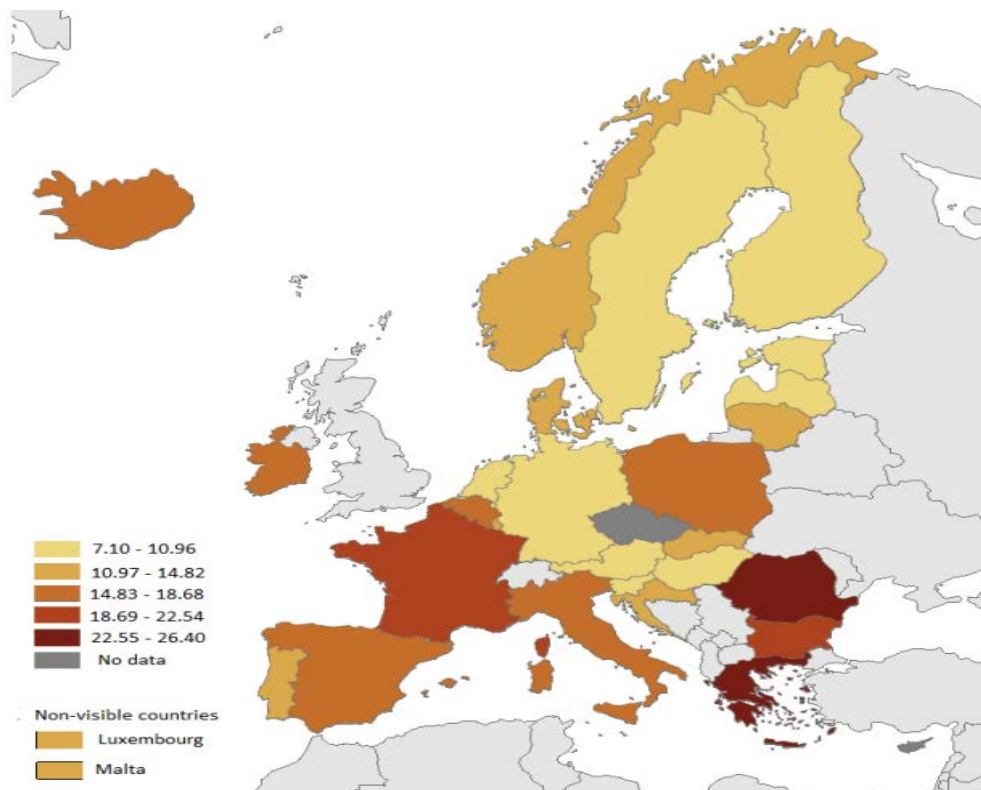
### 3.3. Αίτια

Τα αίτια της μικροβιακής αντοχής εντοπίζονται κυρίως σε τέσσερα φαινόμενα του τελευταίου αιώνα. Πρωτίστως ενοχοποιείται η υπερκατανάλωση (antibiotic overuse) και η ακατάλληλη χρήση (antibiotic misuse) των αντιβιοτικών στους ανθρώπους. Δυστυχώς, η χώρα μας συνεχίζει να κατέχει τα πρωτεία στην Ευρώπη όσον αφορά στην κατανάλωση αντιμικροβιακών στην κοινότητα (**Εικόνες 7 & 8**). Βασική αιτία αυτού του φαινομένου είναι η υπερσυνταγογράφηση αντιβιοτικών από τους επαγγελματίες υγείας αλλά και η έως πρότινος εύκολη προμήθεια του φαρμάκου από το φαρμακείο χωρίς ιατρική συνταγή.





**Εικόνα 8:** Κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση (ATC group J01) στην κοινότητα στην Ευρώπη, έτος αναφοράς 2020. Πηγή: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/rates-country>. **DDD:** Daily Defined Doses (η υποθετική μέση δόση συντήρησης ανά ημέρα για ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την κύρια ένδειξη του σε έναν ενήλικο 70 kg). (Monnet, 2014)



**Εικόνα 9:** Κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση στην κοινότητα (ATC group J01), ανά χώρα, EU/EEA, 2020 (εκφρασμένη ως DDD ανά 1000 κατοίκους ανά μέρα). Πηγή: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ESAC-Net%20AER-2020-Antimicrobial-consumption-in-the-EU-EEA.pdf>

Πέραν της υπερκατανάλωσης αντιβιοτικών από τους ανθρώπους, σημαντικά υψηλά είναι και τα επίπεδα χρήσης αντιμικροβιακών στην κτηνοτροφία, τις ιχθυοκαλλιέργειες και τη γεωργία, με συνέπεια την ανάδυση και διασπορά ανθεκτικών στελεχών στο φυσικό περιβάλλον και στα ζώα και τη μεταφορά τους στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας αλλά και μέσω άμεσης επαφής (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013; E. F. S. A. European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency,, 2017; Woolhouse, Ward, Van Bunnik, & Farrar, 2015; Γριβάκου, 2018). Τα αντιβιοτικά στη ζωική παραγωγή, πέραν από τη χρήση τους για τη θεραπεία των άρρωστων ζώων, χρησιμοποιούνται και ως αυξητικοί παράγοντες ή παράγοντες πάχυνσης. Σε πολλές χώρες παρατηρείται ότι η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία ξεπερνά κατά πολύ τις ποσότητες που χρησιμοποιούνται για τη μικροβιακή χημειοθεραπεία στους ανθρώπους. Δεδομένου ότι παρατηρείται παγκοσμίως αύξηση της ζήτησης σε ζωική πρωτεΐνη, η συνολική βιομάζα των ζώων που εκτρέφονται υπερβαίνει πλέον την παγκόσμια βιομάζα των ανθρώπων (Tilman, Balzer, Hill, & Befort, 2011). Η αυξανόμενη ζήτηση έχει ως συνέπεια την εντατικοποίηση της κτηνοτροφικής παραγωγής και την ανάδυση όλο και περισσότερων ανθεκτικών βακτηρίων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στην Κίνα το 2015 ανιχνεύθηκε το πλασμιδιακό γονίδιο αντοχής στην κολιστίνη *mrc-1* τόσο σε ζώα, κρέατα και λαχανικά, όσο και σε ύδατα και ανθρώπους (Liu et al., 2016; Skov & Monnet, 2016). Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο καθώς η κολιστίνη αποτελεί παραδοσιακά φάρμακο που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική, ενώ αντίθετα, για τους ανθρώπους αποτελεί την τελευταία λύση όταν πρόκειται για λοιμώξεις από πολυανθεκτικά μικρόβια και δη από Εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Τα τελευταία χρόνια έχουν θεσπιστεί νόμοι που περιορίζουν τη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, αρκετοί εκ των οποίων με καθυστέρηση λόγω της αντίστασης που πρόβαλλαν οι βιομηχανίες ζωικής παραγωγής (Γριβάκου, 2018).

Ένας ακόμα παράγοντας που συμβάλλει στην επίταση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής είναι η φαρμακευτική ρύπανση (Bengtsson-Palme & Larsson, 2015; Teixeira et al., 2016). Ιδιαίτερος σε χώρες αυξημένης παραγωγής φαρμάκων όπως η Κίνα και η Ινδία, αλλά και άλλες χώρες της Ασίας, παρατηρείται η αποβολή φαρμακευτικών λυμάτων χωρίς καμία πρότερη επεξεργασία, με άμεση συνέπεια την έκθεση του ανθρώπινου, ζωικού και φυσικού περιβάλλοντος σε ανθεκτικά βακτήρια. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι βάσει εκτιμήσεων, περισσότεροι από 200 εκατομμύρια άνθρωποι στην Ινδία και το Πακιστάν είναι αποικισμένοι από στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες (Rehman et al., 2015). Ενδεικτικά, σε μεγάλο ποσοστό δειγμάτων πόσιμου νερού και υδάτινων απορροών στο Νέο Δελχί ανιχνεύεται η μεταλλο-β-λακταμάση NDM-1. Η περιοχή αυτή αποτέλεσε και το

εφαλτήριο παγκόσμιας μετάδοσης της NDM-1 από το 2008 και μετά, κάνοντας φανερή την ταχύτατη ικανότητα μετάδοσης της μικροβιακής αντοχής (Timothy R Walsh, Weeks, Livermore, & Toleman, 2011).

Πέραν της φαρμακευτικής ρύπανσης, σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή αντοχή φαίνεται να παίζει και η ατμοσφαιρική ρύπανση, με το νέφος να αποτελεί δεξαμενή εξάπλωσης γονιδίων αντοχής, τα οποία εν συνεχεία μεταφέρονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Pal, Bengtsson-Palme, Kristiansson, & Larsson, 2016). Τέλος, αντίστοιχο ρόλο δεξαμενής γονιδίων αντοχής έχουν και οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, καθώς εκεί καταφθάνουν συνεχώς αντιβιοτικά και ανθεκτικά στελέχη αποικισμένων και νοσούντων (Bouki, Venieri, & Diamadopoulos, 2013; Γριβάκου, 2018).

Παρότι το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής απασχολεί όλο και περισσότερο την παγκόσμια ιατρική κοινότητα και τα ήδη υπάρχοντα αντιβιοτικά καθίστανται όλο και περισσότερο αναποτελεσματικά, η ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών χωλαίνει. Βασικοί λόγοι αυτής της έλλειψης είναι η στροφή της έρευνας εκ μέρους των φαρμακοβιομηχανιών ως επί το πλείστον προς ογκολογικά φάρμακα ή φάρμακα χρόνιων παθήσεων, δεδομένου ότι τα αντιβιοτικά έχουν πλέον μικρή πιθανή διάρκεια χρήσης, λόγω του φαινομένου της αντοχής, αλλά και λόγω της δράσης τους απ' εαυτής. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η ανθρωπότητα βρίσκεται εκτεθειμένη στην απειλή της παγκόσμιας διασποράς των πολυανθεκτικών Gram αρνητικών βακτηρίων, χωρίς να έχει ανακαλυφθεί κανένας νέος παράγοντας μετά την ανακάλυψη του ναλιδιξικού οξέος προ 50 ετών. Βρισκόμαστε, όπως γίνεται εμφανές, όλο και πιο κοντά στο ενδεχόμενο ενός μέλλοντος χωρίς αντιβιοτικά (post-antibiotic era) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013; O'neill, 2016; Γριβάκου, 2018).

### **3.4. Μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής**

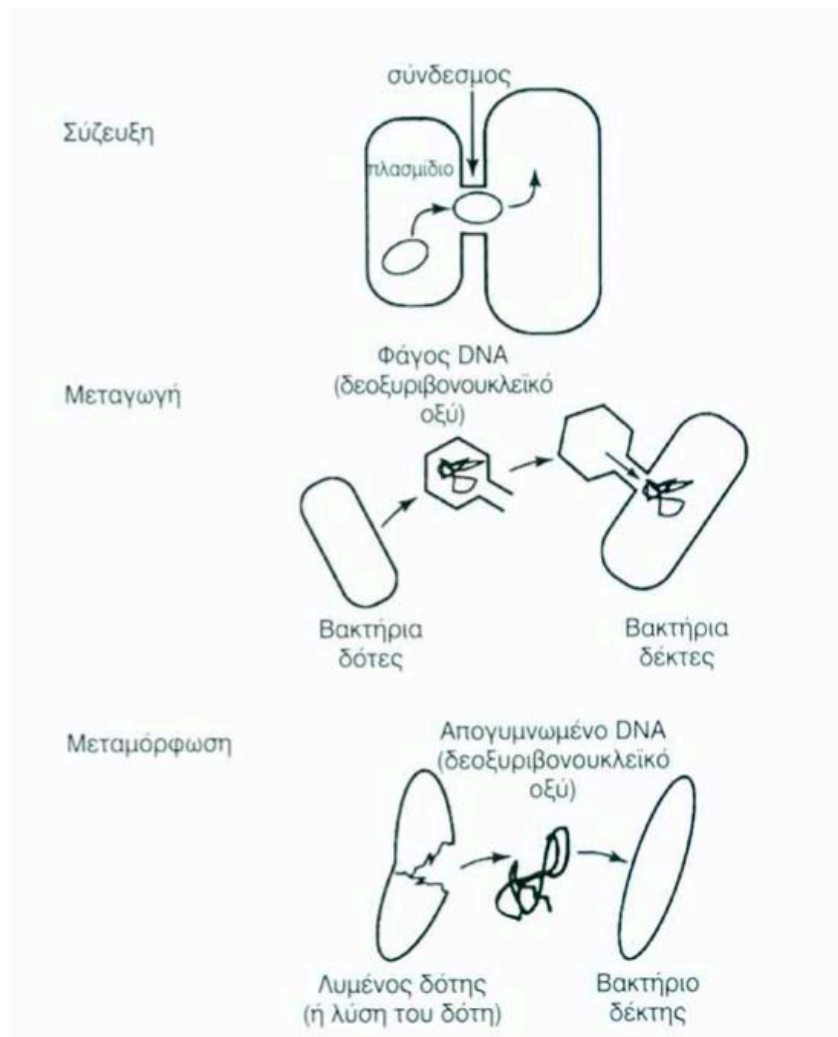
Ο βασικός μηχανισμός επίκτητης ανάπτυξης αντοχής στα αντιβιοτικά είναι η μεταβολή του γενετικού υλικού του μικροβίου. Το γενετικό υλικό των μικροβίων υπάρχει σε δύο διαφορετικές δομές, το χρωμόσωμα και τα πλασμίδια. Ο βαθμός της ομολογίας μεταξύ του γενετικού υλικού των διαφορετικών βακτηρίων αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τους σχέσης (Dobrindt & Hacker, 2001). Λόγω των πολλαπλών σημείων ελέγχου του γενετικού υλικού των βακτηρίων, τα λάθη σπανίζουν. Παρ' όλα αυτά, το DNA των βακτηρίων υφίσταται μεταλλάξεις. Η αλλαγή στο γενετικό υλικό του βακτηρίου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω μετάλλαξης του χρωμοσωμικού DNA του

ίδιου του μικροβίου, είτε μέσω ανταλλαγής γενετικού υλικού – απόκτησης ξένου DNA. Οι δύο αυτές διαδικασίες εκφράζουν τη γενετική βάση της μικροβιακής αντοχής. Η πρώτη διαδικασία είναι αρκετά σπάνια στη φύση – της τάξης του ενός ανά  $10^6$  κυτταρικές διαιρέσεις, και αποτελεί τυχαίο γεγονός. Η αντοχή που προκαλείται είναι χαμηλού επιπέδου και μπορεί να αφορά χημικά συγγενείς αντιμικροβιακές ουσίες ή αντιβιοτικά διαφορετικών χημικών ομάδων. Ωστόσο, αν η μετάλλαξη οδηγήσει σε αντοχή του μικροβίου, αναμένεται η επικράτηση και κλωνική διασπορά του νέου στελέχους μέσω του φαινομένου της πίεσης επιλογής αλλά και της πίεσης που ασκούν τα εξωγενώς χορηγούμενα αντιβιοτικά.

Αντιθέτως η μεταβίβαση γενετικού υλικού είναι συχνότερη και προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου στελέχους, το οποίο θα καταστεί ανθεκτικό. Η μεταβίβαση των γονιδίων αντοχής αφορά ή το χρωμοσωμικό ή το πλασμιδιακό DNA και πραγματοποιείται μέσω των εξής μηχανισμών:

- I. Σύζευξη: Τα πλασμίδια αποτελούν ανεξάρτητες, κυκλικές DNA δομές, εκτός του βακτηριακού γονιδιώματος και αποτελούν το 0.2% του συνολικού DNA του βακτηρίου. Έχουν την ικανότητα ανεξάρτητου από το χρωμοσωμικό DNA πολλαπλασιασμού. Συχνά, σε πολλά πλασμίδια εδράζονται γονίδια αντοχής (πλασμίδια αντοχής, resistance factors). Μέσω του μηχανισμού της σύζευξης τα πλασμίδια μπορούν να μεταφερθούν από ένα βακτήριο σε άλλο. Το πλασμίδιο κωδικοποιεί τη δημιουργία μίας προεξοχής από συμπληρωματικές αναστροφές αλληλουχίες DNA. Η προεξοχή προσκολλάται σε ένα δεύτερο βακτήριο και λειτουργεί ως γέφυρα για τη μεταφορά του πλασμιδιακού DNA από το δότη στο βακτηριακό δέκτη. Μέσω αυτού του μηχανισμού ένα απλό ανθεκτικό βακτήριο μπορεί να μεταφέρει την αντοχή σε άλλα βακτήρια (Southwick, 2008). Η σύζευξη παρατηρείται συχνά μεταξύ Gram αρνητικών βακτηρίων.
- II. Μεταγωγή: Η μεταφορά του γενετικού υλικού του ανθεκτικού βακτηρίου μπορεί να γίνει και μέσω βακτηριοφάγων, δηλαδή DNA δομών επικαλυμμένων με πρωτεΐνη. Οι βακτηριοφάγοι ενσωματώνονται σε ένα σημείο του χρωμοσώματος και κατά την αποκόλλησή τους συμπαρασύρουν ένα τμήμα το οποίο «ενίουν», αφού προσκολληθούν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα ενός ξενιστή.
- III. Μεταμόρφωση: Το βακτήριο-δότης απελευθερώνει γραμμικά κομμάτια χρωμοσωμικού DNA – τα τρανσπονζόνια, τα οποία προσλαμβάνονται από βακτήρια-δέκτες και ενσωματώνονται στο γονιδιώμα τους. Συχνότερα, φυσική μεταμόρφωση απαντάται σε είδη *Streptococcus*, *Haemophilus* και *Neisseria*. Μέσω των μεταθετών

αυτών στοιχείων (mobile genetic elements, MGEs), μπορούν να μεταφέρονται πολλαπλά γονίδια αντοχής μεταξύ συγγενών μικροοργανισμών (Southwick, 2008).



**Εικόνα 10:** Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια μεταφέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (Southwick, 2008).

Τα μεταθετά γενετικά στοιχεία είναι τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια (transposons) και οι γονιδιακές κασέτες (gene cassettes) (Aminov, 2011; Toussaint & Merlin, 2002; Γριβάκου, 2018). Τα **πλασμίδια** είναι κυκλικά τμήματα δίκλωνου DNA εκτός του χρωμοσώματος, τα οποία αντιγράφονται αυτόνομα και φέρουν γονίδια που μπορούν να φανούν χρήσιμα για το βακτήριο σε μεταβολές του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικά, μπορούν να είναι φορείς γονιδίων αντοχής έναντι των αντιβιοτικών. Τα **τρανσποζόνια** είναι μεταθετά στοιχεία, τα οποία φέρουν γονίδια υπεύθυνα για τη μετακίνησή τους αλλά και τουλάχιστον ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Προσδίδουν στον φέροντα οργανισμό ένα συγκεκριμένο

φαινότυπο και έχουν την ικανότητα να μετακινούνται από μία περιοχή του μορίου του DNA σε μια άλλη, του ίδιου ή άλλου μορίου DNA, από ένα πλασμίδιο σε άλλο, αλλά και από το πλασμίδιο στο χρωμόσωμα και αντιστρόφως. Εξ' ου και ο χαρακτηρισμός τους ως γονίδια που «χοροπηδούν» μέσα στο γονιδίωμα (jumping genes) (Pray, 2008). Ωστόσο δεν έχουν τη δυνατότητα να αυτοπολλαπλασιάζονται. Τέλος, οι **γονιδιακές κασέτες** (gene cassettes) είναι μικρά τμήματα κυκλικού DNA, μεγέθους περίπου 500- 1000bp, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από ένα γονίδιο αντοχής μαζί με μία μικρή ανάστροφη αλληλουχία 59 περίπου βάσεων, που ονομάζεται στοιχείο 59 βάσεων (59-be ή *attC*) και λειτουργεί ως ειδική θέση ανασυνδυασμού στο εσωτερικό του ιντεγκρονίου. Τα ενσωματόνια (ιντεγκρόνια, integrons) είναι γενετικές δομές ικανές να ενσωματώσουν τις γονιδιακές κασέτες (Γριβάκου, 2018).

### 3.5. Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής

Ανεξαρτήτως του τρόπου απόκτησης των γονιδίων αντοχής, οι μηχανισμοί έκφρασης της (βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής) είναι κοινοί στα διάφορα μικρόβια (Livermore & Brown, 2001; Strateva & Yordanov, 2009; Ιωσηφίδης, 2013). Περιγράφονται τρεις βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής:

- η αποδόμηση ή τροποποίηση του αντιβιοτικού
- η μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο βακτήριο
- η τροποποίηση του στόχου δράσης των αντιβιοτικών

Βασικός μηχανισμός αδρανοποίησης των αντιβιοτικών και συνηθέστερος μηχανισμός μικροβιακής αντοχής είναι η παραγωγή ενζύμων που διασπούν ή τροποποιούν τα αντιβιοτικά. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι υδρολυτικά, όπως στην περίπτωση των β-λακταμασών, και συνήθως είναι επίκτητα, ή μη υδρολυτικά (π.χ. ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες). Ορισμένα από τα υδρολυτικά ένζυμα εμφανίζονται ενδογενώς σε βακτηριακά είδη, όπως οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες σε Gram αρνητικά βακτηρίδια, ωστόσο η έκφρασή τους διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα,

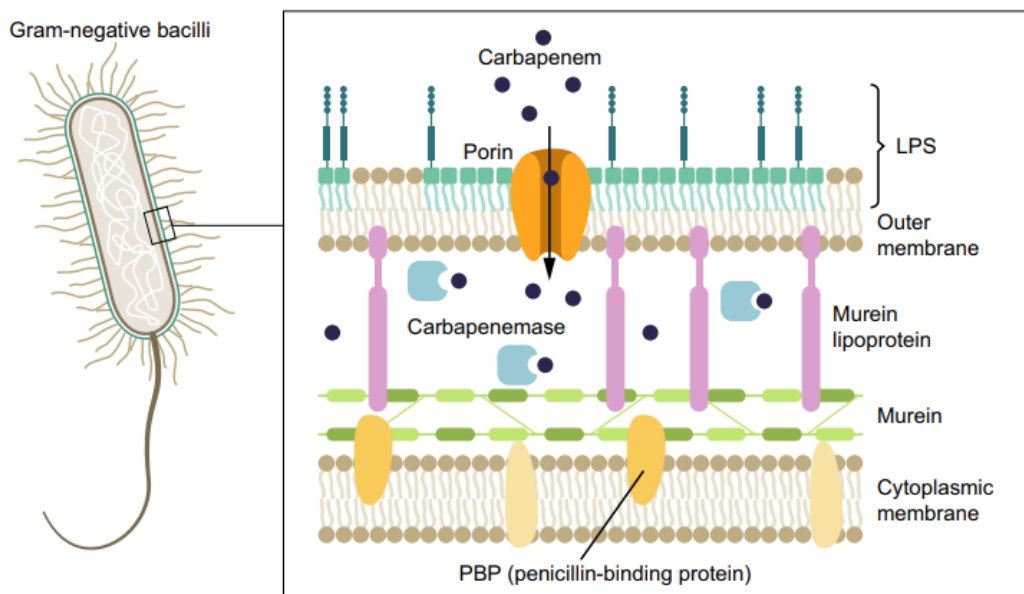
Μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο βακτήριο μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τροποποίησης των διαύλων εισόδου του αντιβιοτικού και μέσω παραγωγής αντλιών εκροής (efflux pumps). Η αντοχή που οφείλεται σε μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου. Όταν, όμως, συνδυαστεί με άλλους μηχανισμούς αντοχής, όπως

η παραγωγή ενζύμων ή η αλλαγή του στόχου, τότε μπορεί να προκύψει υψηλού επιπέδου μικροβιακή αντοχή. Τα gram αρνητικά βακτήρια περιβάλλονται από ένα λιπιδιακό κάλυμμα που εμποδίζει τη δίοδο υδρόφιλων παραγόντων (π.χ. αντιβιοτικών). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η είσοδος του αντιβιοτικού στο βακτήριο διευκολύνεται από την παρουσία πορινών, καναλιών που διευκολύνουν τη δίοδο φορτισμένων μορίων. Μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν στην απώλεια των πορινών και κατά συνέπεια στη μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα οδηγούν σε ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής (Σπυριδοπούλου, 2020).

Ενεργητική έξοδος των αντιβιοτικών παρατηρείται σε πολλά εντεροβακτηριακά. Διάφορα τρανσποζόνια (transposons) κωδικοποιούν τη δημιουργία αντλιών πρωτεϊνικής φύσης, κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, γνωστές ως αντλίες εκροής, οι οποίες ενεργητικά μεταφέρουν αντιβιοτικά εκτός του κυττάρου. Τα συστήματα αντλιών εκροής εμπλέκονται στην εγγενή και στην επίκτητη αντοχή. Ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται κατά την αντιμικροβιακή θεραπεία με τετρακυκλίνη, μακρολίδες και φθοριοκινολόνες, ενώ και κάποιοι σταφυλόκοκκοι (*S.aureus*, *S.epidermidis*) και στρεπτόκοκκοι ( $\beta$  Streptococci, *S.pneumoniae*) τον χρησιμοποιούν για την «προστασία» από τα αντιβιοτικά. Οι αντλίες εκροής απαντούν σε μεγάλο βαθμό στην *Pseudomonas aeruginosa* (Southwick, 2008). Τα γονίδια των αντλιών εκροής είναι αρχαίας προέλευσης και εντοπίζονται στα χρωμοσώματα. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, γονίδια αντλιών εκροής ολοένα και συχνότερα εντοπίζονται σε πλασμίδια συνεπεία της εντεινόμενης πίεσης επιλογής από την αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών. Στη φαρμακευτική αποτελούν πλέον πεδίο εντατικής έρευνας οι αναστολείς αντλιών εκροής (efflux pump inhibitors) (X.-Z. Li, Plésiat, & Nikaido, 2015; Yamaguchi, Nakashima, & Sakurai, 2015).

Τέλος, τροποποίηση του στόχου δράσης των αντιβιοτικών πραγματοποιείται μέσω μεταβολών των πρόδρομων μορφών του κυτταρικού τοιχώματος και είναι η βάση λειτουργίας του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη εντεροκόκκου (VRE). Ανθεκτικά στελέχη *Enterococcus faecium* και *faecalis* περιέχουν πλασμίδια τα οποία αλλάζουν την πεπτιδογλυκανική πρόδρομη μορφή του κυτταρικού τους τοιχώματος. Κατά συνέπεια, μειώνεται η δέσμευση της βανκομυκίνης και της τεϊκοπλανίνης και το μεταλλαγμένο βακτήριο επιβιώνει και αναπτύσσεται παρά την παρουσία των ανωτέρω αντιβιοτικών. Επιπλέον ο στόχος δράσης των αντιβιοτικών μπορεί να τροποποιηθεί μέσω αλλαγών στα ένζυμα στόχους, που είναι σημαντικός μηχανισμός αντοχής των gram θετικών βακτηρίων στις  $\beta$ -λακτάμες. Η τροποποίηση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (PBPs) του βακτηρίου, είτε μέσω μείωσης του αριθμού τους, είτε μέσω χαμηλότερης συγγένειας με την πενικιλίνη, ή και των δύο, ελαττώνει την

ικανότητα των αντιβιοτικών να σκοτώσουν τα βακτήρια-στόχο. Ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται στην ανάπτυξη αντοχής των αντιβιοτικών στον MRSA και στην αντοχή στη σουλφοναμίδη και την τριμεθοπρίμη, αλλά και τις φθοριοκινολόνες. Τέλος, διαφοροποιήσεις στην περιοχή δέσμευσης του ριβοσώματος αποτελούν βάση του μηχανισμού αντοχής των βακτηρίων στις τετρακυκλίνες, λινκοσαμίδες και αμινογλυκοσίδες, οι οποίες δρουν αλλοιώνοντας τη λειτουργία βακτηριακών ριβοσωμάτων.



**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπου φαίνεται η εξωτερική μεμβράνη καθώς και η πορίνη απ' όπου το αντιβιοτικό μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο, ο περιπλασματικός χώρος, όπου εντοπίζονται οι β-λακταμάσες, η κυτταροπλασματική μεμβράνη και οι αντλίες εκροής, οι οποίες μπορούν να εξάγουν τον αντιμικροβιακό παράγοντα από το βακτηριακό κύτταρο. (Tängdén & Giske, 2015)

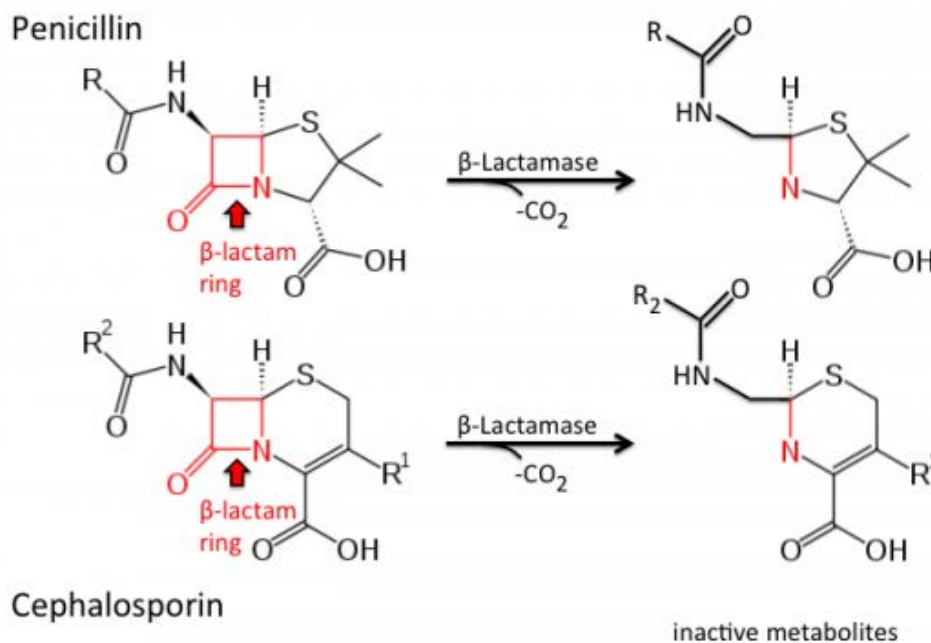
### 3.6. Μηχανισμοί αντοχής των Εντεροβακτηριακών στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Οι βασικοί τέσσερις μηχανισμοί τους οποίους χρησιμοποιούν τα Gram αρνητικά μικρόβια και τους προσδίδουν αντίσταση στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι οι εξής: α) τροποποίηση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) (τροποποίηση στόχου δράσης), β) παρεμπόδιση της εισόδου του φαρμάκου, κυρίως μέσω μεταλλάξεων των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης, γ) ενεργοποίηση αντλιών εκροής (efflux pumps), δ) παραγωγή β-λακταμασών.



Τα Εντεροβακτηριακά χρησιμοποιούν αντίστοιχα έναν ή περισσότερους από τους παραπάνω μηχανισμούς αντοχής. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και η παραγωγή β-λακταμασών αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής των Εντεροβακτηριακών. Στα περισσότερα Gram-αρνητικά βακτηρίδια, οι β-λακτάμες διαπερνούν την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη μέσω διαύλων που σχηματίζονται από τις πρωτεΐνες πορίνες (Outer Membrane Porins, OMPs) (εικόνα 11). Μεταλλάξεις που προκαλούν μειωμένη έκφραση ή δομική αλλαγή των πορινών οδηγούν σε μειωμένη είσοδο του αντιβιοτικού στο κύτταρο και κατά συνέπεια αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Ο σημαντικότερος μηχανισμός άμυνας των Gram αρνητικών βακτηρίων έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι παραγωγή β-λακταμασών (Sanders & Sanders Jr, 1992). Οι β-λακταμάσες κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια και καταλύουν την υδρόλυση του αμιδικού δεσμού  $O=CN$  του β-λακταμικού δακτυλίου της πενικιλίνης και άλλων β-λακταμικών αντιβιοτικών (εικόνα 12). Είναι ενδογενείς ή επίκτητες και μπορούν να παράγονται συνεχώς (ιδιοσυστασιακές) ή με επαγωγή (επαγωγίμες) (Samaha-Kfoury & Aradj, 2003). Σχεδόν όλα τα Εντεροβακτηριακά παράγουν μία κεφαλοσπορινάση, η οποία κωδικοποιείται από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Η παραγωγή τέτοιου είδους ενζύμων αποτελεί βασικό μηχανισμό επίκτητης αντοχής (Χατζηδημητρίου, 2006).



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών

Εδώ και 50 χρόνια έχει διαπιστωθεί η διασπορά των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (ESBL) στα Gram-αρνητικά βακτηρίδια, ιδιαιτέρως στα Εντεροβακτηριακά *K.pneumoniae* και *E.Coli*. Οι ESBL έχουν προκύψει από μεταλλαγές των παλαιότερων β-λακταμασών TEM- (από το όνομα του ασθενή Τεμονιέρα στον οποίο απομονώθηκαν για πρώτη φορά) και SHV-. Οι λακταμάσες αυτές απαντώνται στα Εντεροβακτηριακά, τα οποία χαρακτηριστικά παρουσιάζουν *in vitro* αντοχή στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς (κεφταζιδίμη, κεφτριαξόνη, κεφοταξίμη) καθώς και στην αζτρεονάμη, και *in vitro* ευαισθησία στην κεφοξιτίνη και το συνδυασμό αμοξυκιλλίνης-κλαβουλανικού (Χατζηδημητρίου, 2006). Το 1965, περιγράφηκε ο εντοπισμός του πρώτου πλασμιδιακού ενζύμου (TEM-1) σε στέλεχος *E.Coli*, σε Έλληνα ασθενή (Datta & Kontomichalou, 1965), ενώ στη συνέχεια, παρατηρήθηκε παγκόσμια διασπορά του συγκεκριμένου ενζύμου σε πολλά βακτηριακά είδη, καθώς και εμφάνιση όλο και περισσότερων β-λακταμασών.

Η *Klebsiella pneumoniae* συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από φυσική αντοχή στις αμινοπενικιλίνες (αμπικιλίνη και αμοξυκιλλίνη) και τις καρβοξυπενικιλίνες (καρβενικιλίνη και τικαρσιλλίνη). Μπορεί επίσης να απενεργοποιήσει τις στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες (κεφαλοθίνη και κεφαλεξίνη), όμως με χαμηλές αντίστοιχες ανασταλτικές πυκνότητες (MICs). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις χρωμοσωμικές β-λακταμάσες στην *K.pneumoniae* είναι γνωστά ως *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>LEN</sub>* (Arakawa et al., 1986; Chaves et al., 2001; Livermore, 1995; Σπυριδοπούλου, 2020) .

## 4. Λειτουργική και Μοριακή ταξινόμηση β-Λακταμασών

Οι β-λακταμάσες μπορούν να καταταγούν με βάση τη λειτουργία τους σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με την αναθεωρημένη λειτουργική ταξινόμηση κατά Karen Bush και George A. Jacoby (K. Bush & Jacoby, 2010). Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται οι κεφαλοσπορινάσες που αντιστοιχούν στη μοριακή τάξη C. Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται οι μοριακές κλάσεις A και D, στην οποία ανήκουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες τύπου σερίνης. Η τρίτη ομάδα αντιστοιχεί στις μεταλλο-β-λακταμάσες.

Η ταξινόμηση των β-λακταμασών τις κατατάσσει σε 4 τάξεις κατά Ambler (A, B, C, D), με βάση την ομολογία των αμινοξικών τους ακολουθιών (Ambler, 1980; Hall & Barlow, 2005). Τα ένζυμα κατηγορίας A, C και D είναι πρωτεΐνες με υπόλειμμα σερίνης στις δραστικές τους θέσεις και οι πρωτεΐνες κατηγορίας B είναι μεταλλοένζυμα εξαρτώμενα από ψευδάργυρο. Στη μοριακή τάξη A περιλαμβάνονται πενικιλινάσες και κεφαλοσπορινάσες τύπου TEM και SHV (L. S. Tzouveleki & Bonomo, 1999), οι ευρέως και οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) και οι καρβαπενεμάσες. Αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη (D. L. Paterson & Bonomo, 2005). Τα ένζυμα τάξης B χαρακτηρίζονται ως μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL) και ανήκουν στις καρβαπενεμάσες. Στην τάξη C αντιστοιχούν οι “Amp-C” β-λακταμάσες (Jaurin & Grundstrom, 1981). Στην τελευταία τάξη β-λακταμασών σερίνης κατατάσσονται οι OXA β-λακταμάσες, και καθώς βρέθηκαν να έχουν μικρή ομοιότητα με τα ένζυμα των τάξεων A και C καθορίστηκαν ως τάξη D (Ouellette, Bissonnette, & Roy, 1987).

### 4.1. Καρβαπενεμάσες

#### 4.1.1. Ορισμός, ταξινόμηση και επιδημιολογία

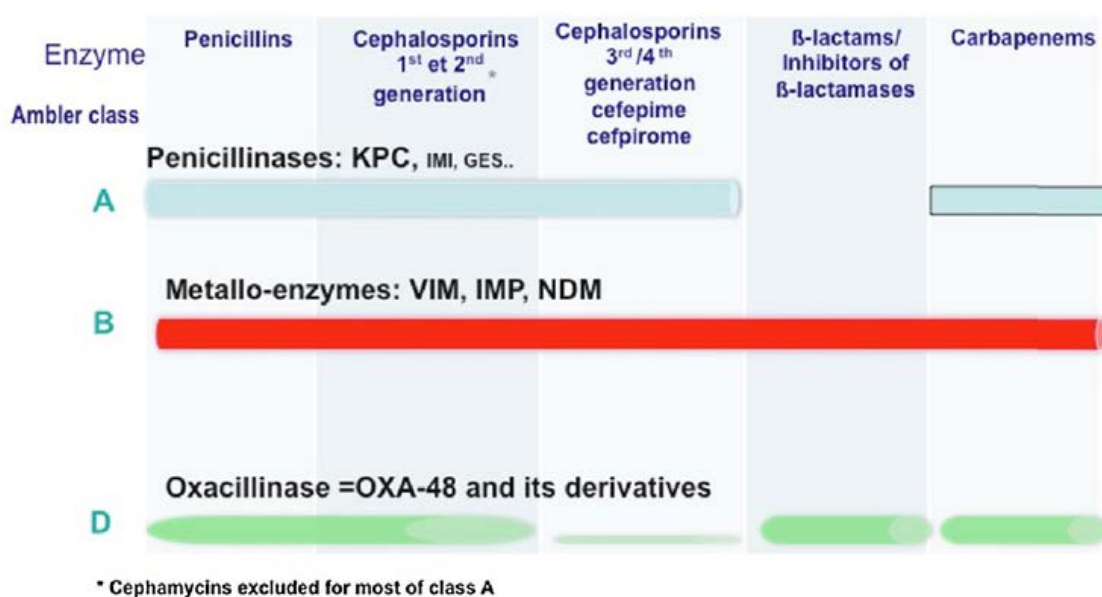
Καρβαπενεμάσες ονομάζονται τα ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενέμες και προσδίδουν στα Gram αρνητικά βακτήρια αντοχή στα αντιβιοτικά αυτά. Ταξινομούνται στις κλάσεις A, C και D β-λακταμασών κατά Ambler.

Molecular class <sup>a</sup> (functional group <sup>b</sup> )	Enzymes	Inhibited by				Gene location	Epidemiological relevance
		CLA	EDTA	ATM	Organisms		
A (2f)	Sme-I to Sme-3, IMI-I to IMI-3, NmCA, SFC-I	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> and <i>Enterobacter cloacae</i>	Ch	±
	KPC-2 <sup>c</sup> to KPC-13	±	-	R	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	PI	++++
B (3)	GES-I to GES-20	+	-	S/R	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	PI	+
	IMP-I to IMP-33, VIM-I to VIM-33, NDM-I to NDM-6, SPM-I, SIM, GIM, IND-I to IND-7, AIM, DIM, KHM	-	+	S	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , and other GNNFB	PI/Ch	±/+++
D (2df) <sup>d</sup>	OXA-23 group (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24 group (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 group (OXA-40, OXA-143) OXA-58 OXA-48 group (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	±	- <sup>e</sup>	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.  
<sup>a</sup>Ambler classification.  
<sup>b</sup>Bush, Jacoby and Medeiros classification.  
<sup>c</sup>KPC-I was later found to be identical to KPC-2.  
<sup>d</sup>Only class D carbapenemases representative of different groups have been included.  
<sup>e</sup>Some OXA enzymes may be slightly inhibited by EDTA.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση καρβαπενεμασών (Canton et al., 2012)

### Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*



Εικόνα 13: Φάσμα δραστικότητας των καρβαπενεμασών των Εντεροβακτηριακών (Patrice Nordmann, 2014)

#### A. Καρβαπενεμάσες μοριακής τάξης A

Οι καρβαπενεμάσες κλάσης A διακρίνονται σε χρωμοσωμικές και πλασμιδιακά κωδικοποιούμενες. Υδρολύουν μια μεγάλη ποικιλία β-λακταμικών αντιβιοτικών μέσω μηχανισμού που απαιτεί την παρουσία ενός ενεργού κέντρου σερίνης (Ambler et al., 1991) και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και την ταζομπακτάμη (εικόνα 13) (Naas,

Dortet, & Iorga, 2016). Τα βακτήρια που παράγουν τέτοιου είδους καρβαπενεμάσες παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία στην ιμιπενέμη (imipenem MIC  $\leq$  4 g/ml), έως πλήρη αντοχή. Έχουν ανιχνευθεί κατά επιδημίες ή σποραδικά στα βακτήρια *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Klebsiella pneumoniae*. Οι βασικές οικογένειες της κατηγορίας αυτής περιλαμβάνουν τα ένζυμα NMC/IMI, SME και KPC.

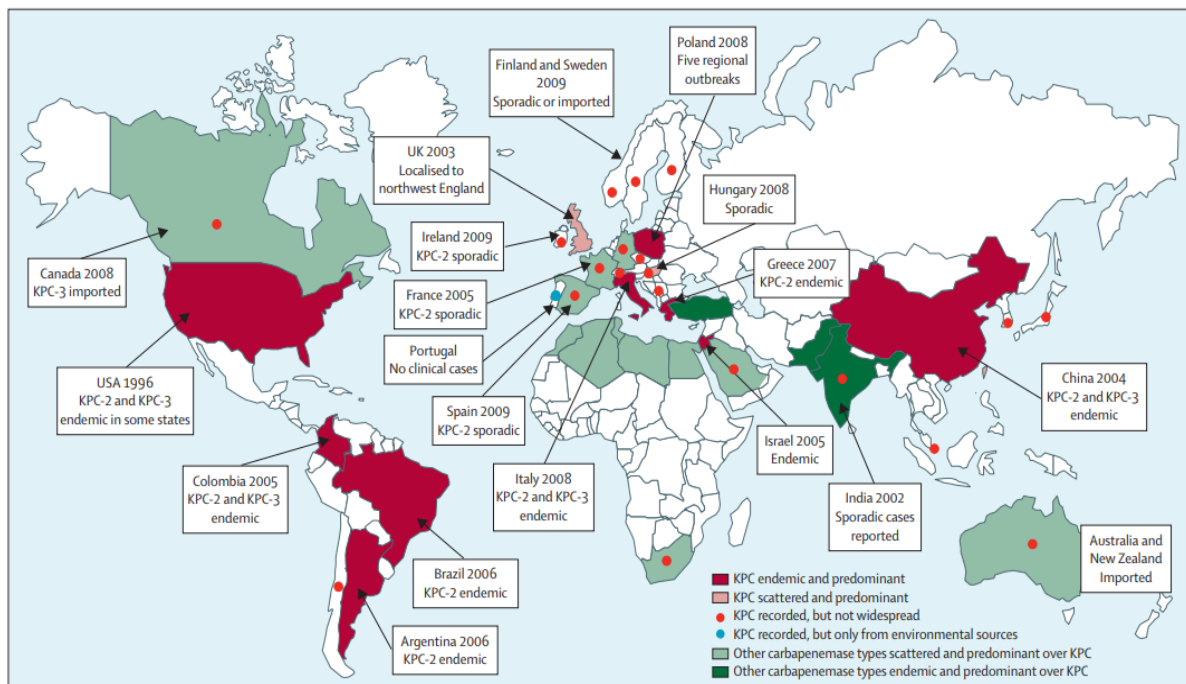
Στα **χρωμοσωμικά** κωδικοποιούμενα ένζυμα συγκαταλέγονται τα SME (*Serratia marcescens* enzyme), NMC (not metalloenzyme carbapenemase) και IMI (imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase). Τα συγκεκριμένα ένζυμα υδρολύουν πενικιλίνες, πρώιμες κεφαλοσπορίνες, την αζτρεονάμη και τις καρβαπενέμες, ενώ διασπούν ανεπαρκώς την κεφοξιτίνη και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (Mariotte-Boyer, Nicolas-Chanoine, & Labia, 1996; Queenan et al., 2000).

Στις **πλασμιδιακά** κωδικοποιούμενες καρβαπενεμάσες ανήκουν οι KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) και GES (Guiana extended spectrum). Τα ένζυμα της οικογένειας GES δεν απαντώνται συχνά. Συνήθως πρόκειται για σποραδικά κρούσματα και μόνο σπάνια έχουν σημειωθεί μικρές επιδημίες (Jeong et al., 2005; L. Poirel, Weldhagen, De Champs, & Nordmann, 2002). Η ομάδα των KPC καρβαπενεμασών περιλαμβάνει 13 ένζυμα (KPC-1/2 έως KPC-13) και αποτελεί την κύρια καρβαπενεμάση των Εντεροβακτηριακών (Vera-Leiva et al., 2017). Αρχικά βρέθηκε σε στελέχη *K.pneumoniae*, ωστόσο πλέον ανιχνεύεται σε μεγάλο εύρος άλλων Εντεροβακτηριακών παγκοσμίως (Miriagou et al., 2010; P. Nordmann, Cuzon, & Naas, 2009; L. S. Tzouveleki, Markogiannakis, Psychogiou, Tassios, & Daikos, 2012), αλλά και σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*. Οι συγκεκριμένες καρβαπενεμάσες υδρολύουν και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, πέραν των πενικιλινών, καρβαπενεμών, αζτρεονάμης, άρα κατ' ουσία, όλα τα  $\beta$ -λακταμικά αντιβιοτικά. Αναστέλλονται ασθενώς από τους αναστολείς  $\beta$ -λακταμασών κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη (Naas et al., 2016).

Μία γρήγορη και ευρεία διασπορά *K.pneumoniae* παράγουσας KPC παρατηρήθηκε στην ανατολική ακτή των ΗΠΑ κατά την πρώτη δεκαετία του 21<sup>ου</sup> αιώνα, με επίκεντρο την πολιτεία της Νέας Υόρκης. Η καρβαπενεμάση KPC-1/2 εμφανίστηκε πρώτη φορά στη Β. Καρολίνα το 1996, σε στέλεχος *K.pneumoniae* (Yigit et al., 2001). Σύντομα, προέκυψαν αναφορές ανίχνευσης και άλλων ενζύμων KPC στις ΗΠΑ, ενώ χαρακτηριστική υπήρξε η επιδημία *K.pneumoniae* παράγουσας KPC-3 από το 2000 έως το 2001 στη Νέα Υόρκη (Woodford et al., 2004). Σταδιακά αναφέρθηκε διασπορά τους παγκοσμίως (**εικόνα 14**), με πρώτη εντόπιση εκτός ΗΠΑ, την επιδημία KPC-3 στο Ισραήλ (P. Nordmann et al., 2009). Στην Ελλάδα, η απομόνωση στελεχών KPC σε *K.pneumoniae* πήρε διαστάσεις επιδημίας σε

τριτοβάθμια νοσοκομεία σε διάστημα μόλις διετίας (2007-2009) (P. Giakkouri et al., 2011) ενώ η παραγωγή KPC-2 φαίνεται να αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό αντοχής των στελεχών *K.pneumoniae* στη χώρα μας (εικόνα 14) (Srygroulou et al., 2016). Επιπλέον, η Ελλάδα θεωρείται ως ενδημική περιοχή για *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες και έχει τεκμηριωθεί η περαιτέρω μετάδοση στελεχών που παράγουν KPC σε τουλάχιστον τέσσερις ευρωπαϊκές χώρες (P. Nordmann et al., 2009; Wernli et al., 2011). Σε μία κατάσταση ενδημίας, τα περισσότερα νοσοκομεία στη χώρα αντιμετωπίζουν κατ' εξακολούθηση περιπτώσεις του εν λόγω βακτηρίου προερχόμενες από αυτόχθονες πηγές (Brolund et al., 2019).

Η ταχεία παγκόσμια διασπορά στελεχών παραγόντων KPC, ιδιαιτέρως της *K.pneumoniae*, υπαινίσσεται πολλαπλά μονοπάτια μετάδοσης. Σύμφωνα με το επικρατέστερο σενάριο, σημαντικό γεγονός στην αλληλουχία αυτή ήταν η εισαγωγή KPC θετικής *K.pneumoniae* στο Ισραήλ από τις ΗΠΑ, την οποία ακολούθησε η διασπορά σε γειτονικές χώρες, και μέσω της Ελλάδας, στην Ευρώπη (Maltezou et al., 2009; L. S. Tzouveleki et al., 2012). Πέραν της απομόνωσης στην *K.pneumoniae*, εξαιρετικά ανησυχητικός είναι και ο εντοπισμός KPC και σε άλλα Εντεροβακτηριακά, αλλά και της KPC-2 σε πλασμίδιο στην *P.aeruginosa* (Villegas et al., 2007). Το 2013, ανακαλύφθηκε και στην Ελλάδα στέλεχος *P.aeruginosa* με παραγωγή KPC, που απομονώθηκε από μεταμοσχευμένο ασθενή (Geladari et al., 2017).



Εικόνα 14: Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά στελεχών που παράγουν KPC ανά χώρα προέλευσης (Munoz-Price et al., 2013)

## B. Καρβαπενεμάσες μοριακής τάξης Β (μεταλλο-β-λακταμάσες)

Στην κατηγορία των μεταλλο-β-λακταμασών (MBL) ανήκουν ένζυμα με ιόντα δισθενών μετάλλων ( $Zn^{2+}$ ) στο ενεργό τους κέντρο, τα οποία υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών, μέσω της αλληλεπίδρασης με τα ιόντα αυτά (**εικόνα 13**) (Crowder, Spencer, & Vila, 2006). Δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη, ενώ είναι ανθεκτικά στην αδρανοποίηση από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη και την ταζομπακτάμη. Αναστέλλονται από μεταλλικούς χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, μέσω δέσμευσης των δισθενών ιόντων του  $Zn^{2+}$ . Μπορούν να διαιρεθούν σε χρωμοσωμιακές μεταλλο-β-λακταμάσες και σε κωδικοποιούμενες από μεταβιβάσιμα γονίδια. Τα χρωμοσωμιακά ένζυμα βρίσκονται σε ευκαιρικά παθογόνα βακτήρια του περιβάλλοντος και δεν συνδέονται με σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις, ενώ αντίθετα, τα επίκτητα και μεταβιβάσιμα μεταλλοένζυμα παρουσιάζουν συνεχή διασπορά.

Οι MBL διαχωρίζονται περαιτέρω σε 3 υποκατηγορίες, B1, B2, B3. Στην πρώτη κατηγορία (B1) συμπεριλαμβάνονται τα ένζυμα VIM (Verona integrin-encoded MBL), IMP (imipenemase) και NDM (New Delhi MBL), που είναι και τα πιο κοινά και σημαντικότερα ένζυμα. Στην κατηγορία B2 περιλαμβάνονται ένζυμα που παράγονται από διάφορα είδη *Aeromonas* και *Serratia*, ενώ στη B3, ένζυμα που παράγονται από τη *Stenotrophomonas maltophilia*.

Η πρώτη επίκτητη μεταλλο-β-λακταμάση ανακαλύφθηκε σε στέλεχος *P.aeruginosa* τη δεκαετία του 1990 στην Ιαπωνία και ονομάστηκε IMP-1 λόγω της αντοχής της στην ιμιπενέμη (Watanabe, Iyobe, Inoue, & Mitsunashi, 1991). Έκτοτε, έχουν παρουσιάσει παγκόσμια διασπορά (**Εικόνα 15**) τόσο μεταξύ των Εντεροβακτηριακών αλλά και αζυμωτικών βακτηρίων, με κύριο εκπρόσωπο την *P.aeruginosa*. Στην οικογένεια IMP ανήκουν περισσότεροι από είκοσι διαφορετικοί τύποι.

Στη δεύτερη μεγάλη οικογένεια μεταλλο-β-λακταμασών ανήκουν τα ένζυμα VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase), τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται σε γενετικά μεταθετά στοιχεία, όπου ενσωματώνονται ως κασέτες γονιδίων (gene cassettes) (Codjoe & Donkor, 2017; L. S. Tzouveleki et al., 2012). Ως εκ τούτου, έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται μεταξύ βακτηρίων ακόμα και διαφορετικού γένους. Στην οικογένεια περιλαμβάνονται περίπου 14 μέλη. Το πρώτο μέλος της οικογένειας (VIM-1) απομονώθηκε στην Ιταλία το 1997 σε στέλεχος *P.aeruginosa* (Verona Imipenemase-1) (Lauretti et al., 1999) και αμέσως μετά το VIM-2 στη Γαλλία. Ακολούθως, κατά την πενταετία 2005-2010, η οικογένεια των VIM εμφάνισε πολύ μεγάλη αύξηση των μελών της

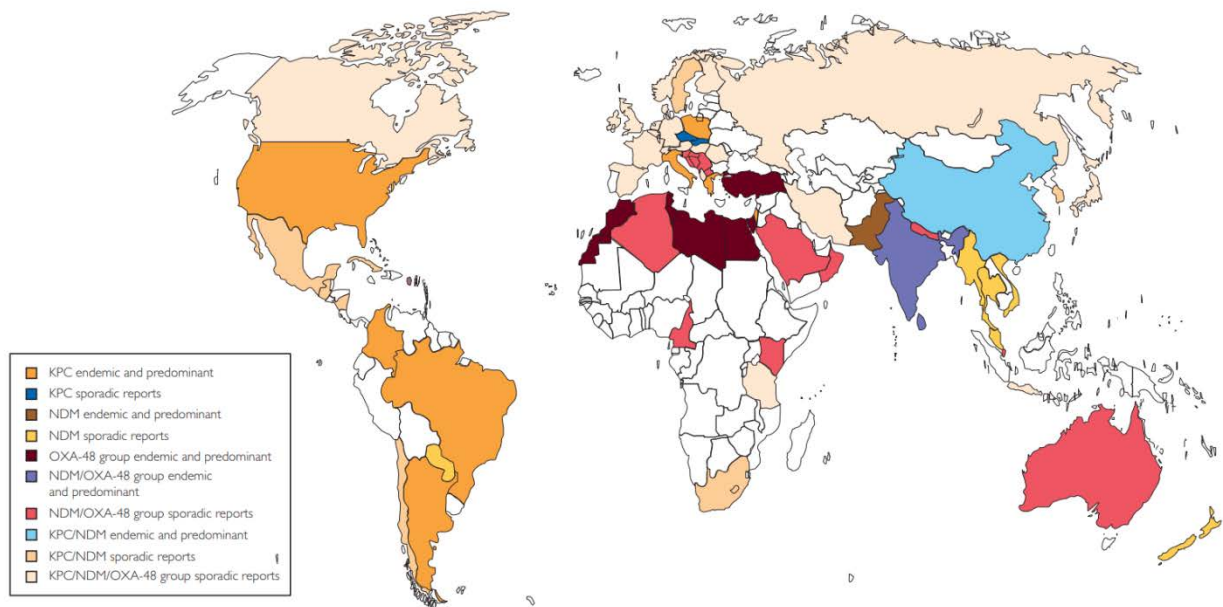
(K. Bush & Fisher, 2011). Αρχικά, οι VIM εντοπίζονταν κυρίως σε αζυμοτικά βακτήρια, στη συνέχεια όμως παρατηρήθηκε διασπορά τους και στα Εντεροβακτηριακά, όπως *E.Coli*, *K.pneumoniae* και *E.cloacae*. Μέχρι πρόσφατα, Εντεροβακτηριακά που παράγουν VIM απομονώνονταν στις Μεσογειακές χώρες, φθάνοντας σε διαστάσεις επιδημίας στη χώρα μας (Vatoroulos, 2008). Ωστόσο, η εξάπλωση τους πλέον δεν αφορά τόσο την Ελλάδα αλλά πολλές χώρες του κόσμου και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας (G. L. Daikos et al., 2007; Galani, Souli, Chryssouli, Orlandou, & Giamarellou, 2005; V. Miriagou, E. Tzelepi, D. Gianneli, & L. S. Tzouveleakis, 2003; Vourli et al., 2006).

Το νεότερο μέλος της οικογένειας των μεταλλο-β-λακταμασών είναι η NDM (New Delhi metallo-β-lactamase). Το 2008 περιγράφηκε η NDM-1, η οποία πήρε το όνομά της από το Νέο Δελχί της Ινδίας, λόγω της ανεύρεσής της σε Σουηδό ασθενή, ο οποίος είχε νοσηλευθεί προηγουμένως σε νοσοκομείο της Ινδίας (Dortet, Poirel, & Nordmann, 2014; Yong et al., 2009). Το γονίδιο που κωδικοποιεί το NDM-1 εντοπίστηκε σε πλασμίδιο, σε ένα μεταβιβάσιμο γενετικό στοιχείο μεγέθους 180-kb , που περιέχει ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων (Yong et al., 2009). Γονίδια *bla<sub>NDM</sub>* έχουν επεκταθεί όχι μόνο σε Εντεροβακτηριακά, αλλά και σε *Acinetobacter* και *Pseudomonas* (T. R. Walsh, Toleman, Poirel, & Nordmann, 2005), ενώ έχουν τυποποιηθεί συνολικά 24 παραλλαγές. Υδρολύουν σχεδόν όλα τα λακταμικά, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμασών, αλλά όχι τις μονομακτάμες (εικόνα 13). Τα NDM θετικά στελέχη είναι συνήθως ανθεκτικά και σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών λόγω της συνύπαρξης πρόσθετων μηχανισμών αντοχής (P. Nordmann, Poirel, Walsh, & Livermore, 2011). Ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό των Εντεροβακτηριακών που παράγουν NDM, πέρα από την ταχεία εξάπλωσή τους είναι η συσχέτισή τους με υψηλή θνητότητα (Guducuoglu et al., 2018).

Αντίθετα με τα φτωχά συστήματα καταγραφής της διασποράς των προηγούμενων MBL ενζύμων, τα αποτελέσματα της παγκόσμιας προσπάθειας για την αποκάλυψη των μονοπατιών μετάδοσης και της επίδρασης στη δημόσια υγεία των Εντεροβακτηριακών που παράγουν NDM, κυρίως της *K.pneumoniae* και του *E.Coli*, είναι εντυπωσιακά. Όπως προαναφέρθηκε, το επίκεντρο της εκτενούς διασποράς τους είναι η Ινδική χερσόνησος, όπου έχει καταγραφεί κατ' εξακολούθηση υψηλή συχνότητα απομόνωσης τους. Από την πρώτη ταυτοποίησή τους και μετά έχει παρατηρηθεί παγκόσμια διασπορά των ενζύμων, με δεύτερες σε συχνότητα περιοχές εντόπισης τα Βαλκάνια και τη Μέση Ανατολή (Dortet et al., 2014), χωρίς ωστόσο να έχει γίνει εφικτή η σύνδεση μεταξύ αυτών και της Ινδίας (Halaby et al., 2012). Αντιθέτως, η πρόσφατη διασπορά των στελεχών που παράγουν NDM στη Δυτική Ευρώπη, τη Βόρειο Αμερική, την Αυστραλία και την Άπω Ανατολή έχει ξεκάθαρα αποδοθεί



σε ασθενείς προερχόμενους από την Ινδία, το Πακιστάν και το Μπαγκλαντές (P. Nordmann, Poirel, Toleman, & Walsh, 2011; L. S. Tzouvelekis et al., 2012).



**Εικόνα 15:** Κατανομή *K.pneumoniae* καρβαπενεμάσης (KPC), New-Delhi μεταλλο-β-λακταμάσης (NDM) και OXA-48 καρβαπενεμασών παγκοσμίως (Shawn Vasoo, Barreto, & Tosh, 2015)

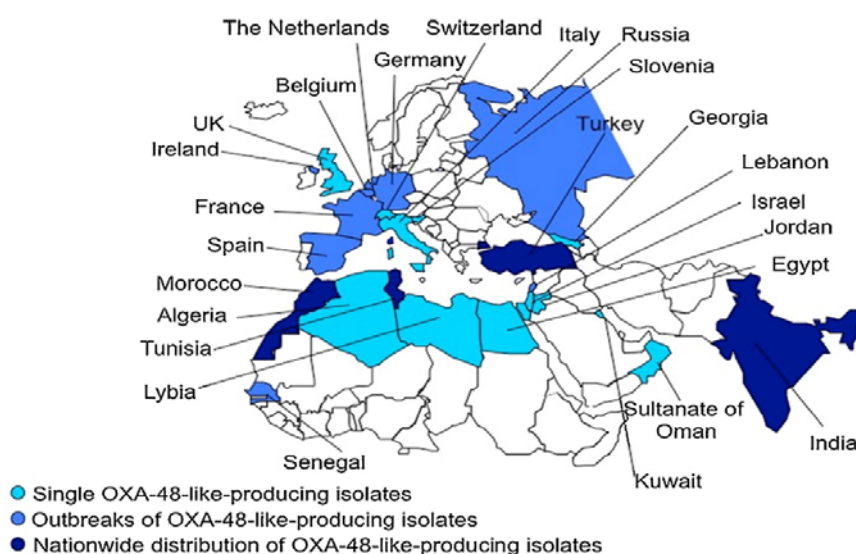
### Γ. Καρβαπενεμάσες μοριακής τάξης D (OXA-τύπου καρβαπενεμάσες)

Η κλάση D περιλαμβάνει τις OXA (oxacillin-hydrolyzing) -τύπου καρβαπενεμάσες, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στο *Acinetobacter spp.* Υπάρχουν 9 μείζονες υποομάδες OXA-τύπου καρβαπενεμασών (Queenan & Bush, 2007). Οι OXA-καρβαπενεμάσες υδρολύουν πενικιλίνες, 1ης και 2ης γενιάς κεφαλοσπορίνες, δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη ενώ υδρολύουν ασθενώς τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (εικόνα 13). Αναστέλλονται ασθενώς από τους αναστολείς β-λακταμασών και χαρακτηριστική είναι η αναστολή τους από το NaCl. Έχουν χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών (100-1000 φορές μικρότερη από τις μεταλλο-β-λακταμάσες), ενώ η εισδοχή μίας αλληλουχίας ή η συνύπαρξη συστήματος ενεργητικής εκροής μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή στην ιμιπενέμη.

Η πρώτη OXA-τύπου καρβαπενεμάση ανιχνεύθηκε στο Εδιμβούργο το 1993 σε στέλεχος *A.baumannii*, που απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος (Paton et al., 1993). Η ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*), όπως ονομάστηκε, μετονομάστηκε αργότερα σε OXA-23 (Paton et al., 1993). Έκτοτε, η OXA-23 έχει ταυτοποιηθεί σε επιδημίες ανθεκτικού στις καρβαπενέμες *Acinetobacter* σε Βραζιλία, Κορέα και Αγγλία (Dalla-Costa et al., 2003; Jeon et al., 2005; Naas, Levy, Hirschauer, Marchandin, & Nordmann, 2005). Η OXA-58 έχει ανιχνευθεί σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter spp* σε πολλές χώρες, μεταξύ των

οποίων και η Ελλάδα (S. Rounaras et al., 2006). Η OXA-51 έχει τυποποιηθεί σε όλα τα στελέχη *A. baumannii* ως φυσικό συστατικό του χρωμοσώματος.

Η OXA-48 καρβαπενεμάση είναι ένζυμο που υδρολύει τις καρβαπενέμες σε επίπεδο πολύ υψηλότερο από εκείνο των υπόλοιπων OXA-τύπου καρβαπενεμασών και παρουσιάζει παρόμοια υδρολυτική ικανότητα με τις KPC. Είναι δύσκολη στην ανίχνευση διότι συχνά διατηρεί ευαισθησία στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και μονομπακτάμες. Δεν έχουν τυποποιηθεί ειδικοί αναστολείς για την OXA-48 καρβαπενεμάση (Tzanetou, 2011). Παρουσιάζει σε ποσοστό μικρότερο του 50% αμινοξική ταυτότητα με τα άλλα OXA ένζυμα και εντοπίζεται σε μεταβιβάσιμο πλασμίδιο. Πρώτη φορά ανιχνεύθηκε το 2001 σε πολυανθεκτικό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* στην Τουρκία, σε ασθενή που νοσηλευόταν για λοίμωξη του ουροποιητικού (L. Poirel, Heritier, Tolun, & Nordmann, 2004). Σύντομα, ακολούθησαν μικρές επιδημίες στις κύριες πόλεις της χώρας. Οι OXA-48 ανιχνεύθηκαν τελευταία σε Εντεροβακτηριακά (*K.pneumoniae*, *E.coli*), των οποίων αποτελούν το κυρίαρχο στέλεχος OXA-τύπου καρβαπενεμασών (L. Poirel, Potron, & Nordmann, 2012), σε πολλές χώρες του κόσμου (Μέση Ανατολή, Ινδία, Ευρώπη και Β. Αφρική) (Carrer et al., 2010) (εικόνα 16). Δεν έχουν ακόμα ανιχνευθεί σε στελέχη *Acinetobacter* ή *Pseudomonas*. Η κύρια δεξαμενή παραμένει η Μέση Ανατολή και η Βόρεια Αφρική. Η πρόσφατη όμως απομόνωση *K.pneumoniae* με OXA-48 στην Ινδία, τη Σενεγάλη και την Αργεντινή υποδηλώνει ότι η επέκτασή τους πρέπει να θεωρείται διεθνής (Σπυριδοπούλου, 2020). Το 2012 περιγράφεται η πρώτη νοσοκομειακή επιδημία στελέχους *K.pneumoniae* που παρήγαγε την καρβαπενεμάση OXA-48 σε ελληνικό νοσοκομείο (Voulgari et al., 2013).



Εικόνα 16: Διασπορά στελεχών που παράγουν OXA-48 (Patrice Nordmann, 2014)

#### 4.1.2. Ανίχνευση καρβαπενεμασών

Η ανίχνευση των καρβαπενεμασών αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα για τον περιορισμό της εξάπλωσής τους. Μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω κλασικών τεχνικών της κλινικής μικροβιολογίας καθώς και μέσω μοριακών τεχνικών. Οι τελευταίες κερδίζουν έδαφος όλο και περισσότερο στα σύγχρονα εργαστήρια, δεδομένων των περιορισμών που εμφανίζουν οι φαινοτυπικές τεχνικές. Η ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες σε κλινικά δείγματα παρουσιάζει κλινικό και εργαστηριακό ενδιαφέρον με περιορισμό όμως την δυσκολία στην επιλογή των βακτηριακών στελεχών που θα εξεταστούν. Η επιλογή αυτή μπορεί να βασιστεί στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ευαισθησίας βάσει των επιδημιολογικών κατωφλιών αντοχής (epidemiological cutoff, ECOFF) (εικόνα 17).

Οι προτεινόμενες MICs από το EUCAST για τα *Enterobacterales* είναι >2 mg/L για τη μεροπενέμη και την ιμιπενέμη και >0.5 mg/L για την ερταπενέμη, ενώ στο όριο πάνω από το οποίο γίνεται έλεγχος για παραγωγή καρβαπενεμάσης είναι >0.125 mg/L (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017) (πίνακας 2). Το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) προτείνει την επιλογή στελεχών βάσει κλινικών κατωφλιών. Συγκεκριμένα, στελέχη με ενδιάμεση ευαισθησία ή αντοχή σε τουλάχιστον μία καρβαπενέμη και σε μία κεφαλοσπορίνη 3<sup>ης</sup> γενιάς (κεφτριαζόνη, κεφοταξίμη ή κεφταζιδίμη) θα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω. Τα όρια ευαισθησίας που προτείνει το CLSI για τα Εντεροβακτηριακά είναι: ευαισθησία  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$  και αντοχή  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη και ευαισθησία  $\leq 0.5$   $\mu\text{g/ml}$  και αντοχή  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  για την ερταπενέμη (πίνακας 3) (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017; Miriagou et al., 2010). Κατά συνέπεια, η ερταπενέμη θεωρείται ο πιο ευαίσθητος δείκτης τουλάχιστον για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν KPC (Bratu et al., 2005).

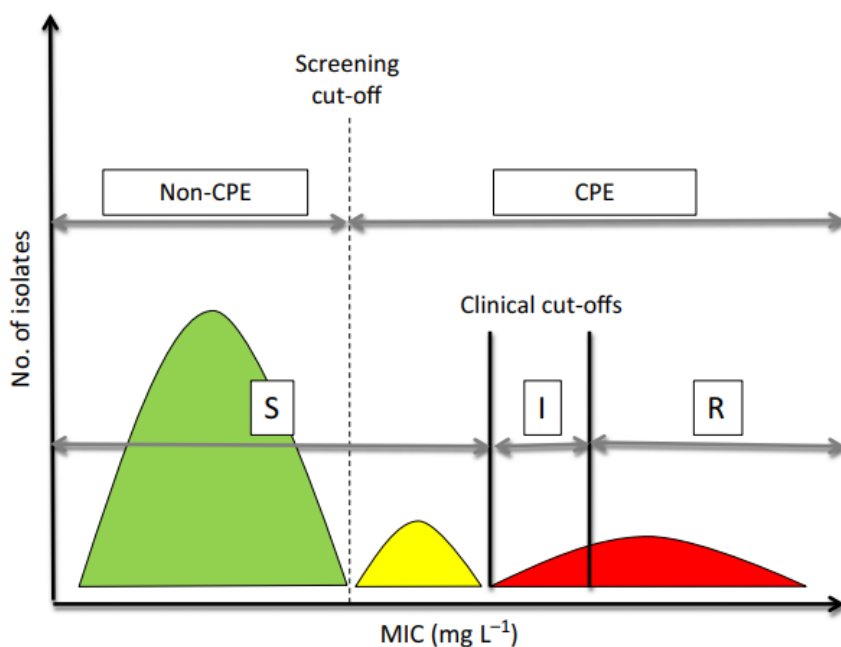
**Πίνακας 2:** Κλινικά breakpoints και τιμές cut-off για τον έλεγχο παραγωγής καρβαπενεμάσης σε *Enterobacterales* (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017).

Καρβαπενέμη	MIC (mg / L)		Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm) με δίσκους 10 $\mu\text{g}$	
	Κλινικά breakpoints (S)	Screening cutoff	Κλινικά breakpoints (S)	Screening cutoff
Μεροπενέμη <sup>1</sup>	$\leq 2$	>0.125	$\geq 22$	<28 <sup>2</sup>
Ερταπενέμη 3	$\leq 0.5$	>0.125	$\geq 25$	<25

<sup>1</sup> Καλύτερη ισορροπία μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας. <sup>2</sup> Στελέχη με διάμετρο 25-27 mm πρέπει να διερευνηθούν για παραγωγή καρβαπενεμάσης αν είναι ανθεκτικά σε πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη και / ή τεμοκιλλίνη. Διερεύνηση για καρβαπενεμάσες πρέπει να εφαρμόζεται εάν η διάμετρος ζώνης της μεροπενέμης είναι <25mm. <sup>3</sup> Υψηλή ευαισθησία αλλά χαμηλή ειδικότητα.

**Πίνακας 3:** Κλινικά κατώφλια για την περαιτέρω εξέταση στελεχών Εντεοβακτηριακών για παραγωγή καρβαπενεμασών (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017)

Αντιμικροβιακός παράγων	Περιεχόμενο δίσκου	Breakpoints διαμέτρου ζώνης αναστολής (mm)			Breakpoints MIC (µg/ml)			Σχόλια
		S	I	R	S	I	R	
Δοριπενέμη	10µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4	Για δοσολογία 500mg/8h
Ερταπενέμη	10µg	≥23	19-21	≤19	≤0.5	1	≥2	Για δοσολογία 1g/24h
Ιμπενέμη	10µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4	Για δοσολογία 500mg/6h ή 1g/8h
Μεροπενέμη	10µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4	Για δοσολογία 1g/8h



**Εικόνα 17:** Σχηματική αναπαράσταση των κλινικών κατωφλίων και των κατωφλίων screening για τις καρβαπενέμες και τα Εντεροβακτηριακά. Από τη σκοπιά του ελέγχου λοιμώξεων, είναι σημαντικό να προσδιοριστούν τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες, τα οποία δεν αναγνωρίζονται επαρκώς από τα κλινικά κατώφλια, καθώς κάποια από αυτά θα αξιολογηθούν ως ευαίσθητα. Γι' αυτό το λόγο το EUCAST έχει ορίσει ένα όριο περαιτέρω εξέτασης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί γι' αυτό το λόγο. (Tängdén & Giske, 2015)

## A. Μικροβιολογικές μέθοδοι ανίχνευσης καρβαπενεμασών με αναστολείς

### i. Τροποποιημένο Hodge test (Modified Hodge test, MHT)

Είναι η παλαιότερα προτεινόμενη από το CLSI μέθοδος για τη διερεύνηση της παραγωγής καρβαπενεμάσης σε κλινικά δείγματα, με βασικό μειονέκτημα την αδυναμία περαιτέρω προσδιορισμού του είδους της εμπλεκόμενης καρβαπενεμάσης (Miriagou et al., 2010). Για τη διενέργειά της, ενοφθαλμίζεται εναιώρημα 0.5 McFarland πρότυπου στελέχους *E.Coli* ATCC 25922, το οποίο είναι εξ' ορισμού ευαίσθητο στις καρβαπενέμες σε Muller-Hinton άγαρ, ενώ στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος μεροπενέμης (10μg) ή ερταπενέμης. 3-5 αποικίες του εξεταζόμενου στελέχους επιστρώνονται υπό μορφή λωρίδας από το δίσκο ως το άκρο του τρυβλίου. Ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης είναι η παραμόρφωση της άλω αναστολής γύρω από το εξεταζόμενο βακτήριο (εικόνα 18) (Tzanetou, 2011).

Βασικό πλεονέκτημα του τροποποιημένου Hodge test είναι η δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου περισσότερων του ενός στελεχών στο ίδιο τρυβλίο. Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει αρκετές αδυναμίες, με βασικότερη, όπως προαναφέρθηκε, την αδυναμία προσδιορισμού του τύπου καρβαπενεμάσης. Επιπλέον, μπορούν να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με στελέχη που παράγουν CTX-M-ESBLs ή υψηλά ποσά AmpC β-λακταμασών (Miriagou et al., 2010; F. Pasteran, T. Mendez, L. Guerriero, M. Rapoport, & A. Corso, 2009). Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν με Εντεροβακτηριακά που παράγουν MBL με χαμηλή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης (Miriagou et al., 2010). Τέλος το τεστ έχει αποδειχθεί ότι έχει χαμηλή ευαισθησία (50%) για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν NDM, ποσοστό που ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί στο 85.7% με την προσθήκη ZnSO<sub>4</sub> (100μg/ml) στο υπόστρωμα της καλλιέργειας (Dortet et al., 2014; Girlich, Poirel, & Nordmann, 2012). Παρ' όλα αυτά, παραμένει μία εύκολη μεθοδολογία η οποία σε συνδυασμό με κάποια επιπλέον δοκιμασία μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη καρβαπενεμασών.



**Εικόνα 18:** Τροποποιημένη δοκιμασία του Hodge (modified Hodge test). Mueller-Hinton άγαρ επιστρώνεται με εναιώρημα πυκνότητας 0.5 McFarland προτύπου στελέχους *E. Coli* (ATCC 25922), ενώ στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος μεροπενεμ (MEM) (10 µg). Τα εξεταζόμενα για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελέχη επιστρώνονται υπό μορφή λωρίδας από το δίσκο μέχρι το χείλος του τρυβλίου. Παραμόρφωση της ζώνης αναστολής (διακοπή του κύκλου αναστολής) γύρω από το εξεταζόμενο βακτήριο θεωρείται ενδεικτική παραγωγής καρβαπενεμάσης. A και B στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1 και KPC αντίστοιχα. C, αρνητικός μάρτυρας. (Tzanetou, 2011)

## ii. Ανίχνευση MBL με χηλικούς παράγοντες

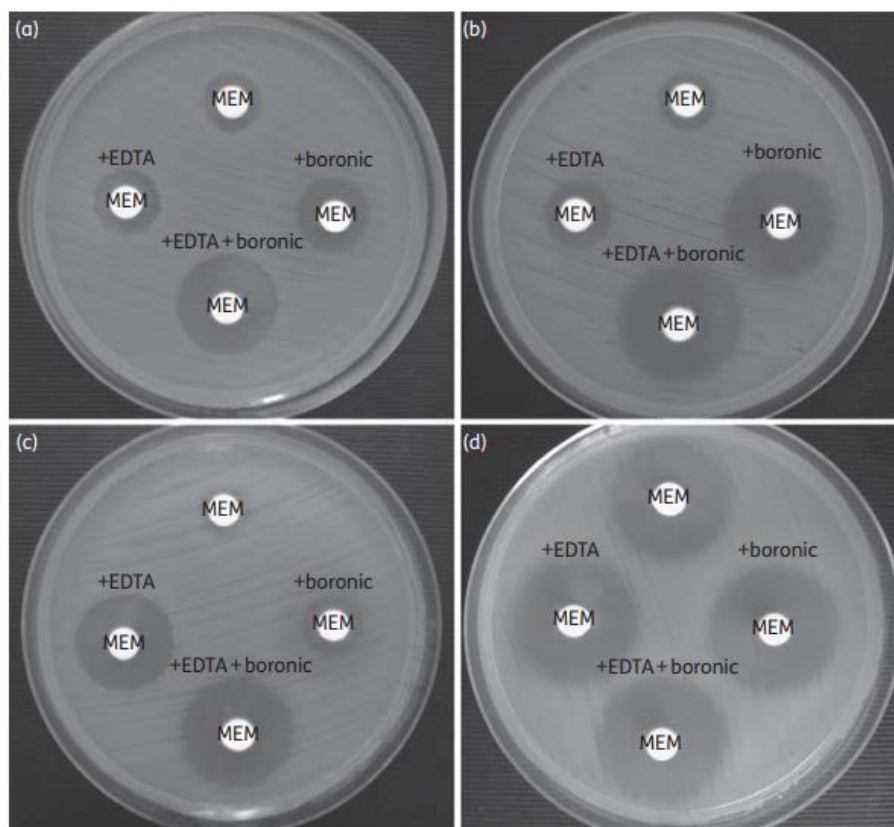
Έχουν αναπτυχθεί αρκετά τεστ για την ειδική ανίχνευση μικροβίων που παράγουν MBL, βασισμένα σε αναστολείς. Οι δοκιμασίες αυτές βασίζονται στη συνέργεια μεταξύ των αναστολέων των MBL (όπως το EDTA) (Lee et al., 2001; Yong et al., 2002) και μίας καρβαπενέμης (ιμιπενέμης ή/και μεροπενέμης), καθώς και μίας κεφαλοσπορίνης 3<sup>ης</sup> γενιάς ως δείκτη β-λακταμικών συστατικών. Κατά τις δοκιμασίες γίνεται εκμετάλλευση της εξάρτησης των μεταλλοενζύμων από τα ιόντα ψευδαργύρου με συνέπεια οι MBL να καθίστανται ανενεργείς, και χρήση των χηλικών παραγόντων ώστε να ανασταλεί η υδρόλυση των β-λακταμών. Έχουν χρησιμοποιηθεί και αξιολογηθεί διάφορες μορφές δοκιμασιών συνέργειας βασισμένων στο EDTA. Η δοκιμασία συνέργειας με δύο δίσκους (double-disk synergy test, DDST) και η δοκιμασία συνδυασμού με χηλικό παράγοντα (combined disk test, CDT) παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία ακόμα και για στελέχη με χαμηλό επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες.

Στη δοκιμασία συνέργειας, τοποθετείται δίσκος ιμιπενέμης ή κεφταζιδίμης σε απόσταση από δίσκο ο οποίος 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. Η δοκιμασία Etest MBL strip βασίζεται επίσης στη συνέργεια μεταξύ EDTA και ιμιπενέμης και έχει βρεθεί ότι έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση *P.aeruginosa* παράγουσας MBL (T. R. Walsh, Bolmstrom, Qwarnstrom, & Gales, 2002). Παρά την καλή απόδοση των δοκιμασιών με αναστολείς στην ανίχνευση MBL, πρέπει να τονιστεί, ότι οι παράγοντες αυτοί δρουν μη ειδικώς και επηρεάζουν κι άλλες δομές και διαδικασίες (πχ διαπερατότητα εξωτερικής μεμβράνης στην *P.aeruginosa*) (Y. W. Chu, Cheung, Ngan, & Kam, 2005), με συνέπεια να συνιστάται η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων και με άλλες μεθοδολογίες (Miriagou et al., 2010).

### iii. Ανίχνευση KPC με παράγωγα του βορονικού οξέος

Συγκεκριμένες φαινοτυπικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση της παρουσίας στελεχών που παράγουν KPC βασίζονται στην ανασταλτική δράση των βορονικών οξέων, συνήθως του 3-αμινοφαινυλβορονικού οξέος (APB), χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός αναστολής (Doi et al., 2008; Athanassios Tsakris et al., 2009). Ο δίσκος ερταπενέμης έχει προταθεί ως ο πλέον κατάλληλος για την ανίχνευση των KPC σε Εντεροβακτηριακά. Οι μέθοδοι αυτές έχει βρεθεί ότι έχουν υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση στελεχών που παράγουν KPC. Ωστόσο φαίνεται ότι υστερούν σε ειδικότητα, ειδικά σε περιπτώσεις στις οποίες τα στελέχη παράγουν AmpC β-λακταμάσες, δεδομένου ότι τα παράγωγα του βορονικού οξέος είναι ικανοί αναστολείς αυτών των ενζύμων. Ο περιορισμός αυτός μπορεί να ξεπεραστεί εν μέρει με την ταυτόχρονη χρήση κλοξακιλλίνης, η οποία αναστέλλει εκλεκτικά τις κεφαλοσπορινάσες (Giske et al., 2011). Στη συγκεκριμένη περίπτωση συνιστάται η χρήση δίσκων ιμιπενέμης ή μεροπενέμης και όχι ερταπενέμης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δοκιμασία συνδυασμού δίσκων (combined-disc test), κατά την οποία μπορεί να γίνει ταυτόχρονα ανίχνευση παραγωγής KPC και MBL από ένα βακτηριακό στέλεχος. Χρησιμοποιείται ένας δίσκος καρβαπενέμης χωρίς αναστολέα και τρεις δίσκοι καρβαπενέμης εμπλουτισμένοι με EDTA, βορονικό και συνδυασμό EDTA και βορονικού. Όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής γύρω από το δίσκο με το EDTA και το βορονικό είναι  $\geq 5\text{mm}$  σε σχέση με τους υπόλοιπους δίσκους, η δοκιμασία θεωρείται θετική (εικόνα 19) (A. Tsakris et al., 2010).



**Εικόνα 19:** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα τριών δοκιμασιών συνδυασμού δίσκων. Χρησιμοποιούνται σκέτοι δίσκοι μεροπενέμης, και δίσκοι με EDTA, βορονικό οξύ και συνδυασμό EDTA/BA για: α) στέλεχος παράγον KPC/VIM/ESBL, β) στέλεχος παράγον KPC/ESBL, γ) στέλεχος παράγον VIM, δ) στέλεχος παράγον AmpC/ESBL. (A. Tsakris et al., 2010)

#### iv. Μέθοδος απενεργοποίησης καρβαπενέμης

Η μέθοδος απενεργοποίησης καρβαπενέμης (carbapenem inactivation method, CIM) είναι άλλη μία αποτελεσματική φαινοτυπική μέθοδος, κατά την οποία γίνεται ανίχνευση της ενζυμικής υδρόλυσης μιας καρβαπενέμης με επώαση σε βακτηριακό εναιώρημα (van der Zwaluw et al., 2015). Η δραστηριότητα καρβαπενεμάσης των υπό μελέτη βακτηρίων ελέγχεται μέσω μέτρησης της διαμέτρου της ζώνης αναστολής του *E.Coli* ATCC 25922, αφού ο δίσκος της καρβαπενέμης απενεργοποιηθεί από το υπό μελέτη βακτήριο. Τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της παρουσίας γονιδίων καρβαπενεμάσης, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48, OXA-23 (ανίχνευση με PCR), σε ποσοστό συμφωνίας 100% για τα Εντεροβακτηριακά (van der Zwaluw et al., 2015). Το τροποποιημένο CIM έγινε η προτεινόμενη μέθοδος ανίχνευσης του CLSI το 2017, καθώς είναι μία απλή, φθηνή, αναπαραγώγιμη μέθοδος για την ανίχνευση της



παραγωγής καρβαπενεμάσης. Ένα κύριο μειονέκτημα ωστόσο της τεχνικής αυτής είναι ότι χρειάζονται τουλάχιστον 18 ώρες για τη λήψη αποτελεσμάτων (Pierce et al., 2017).

#### v. Ανίχνευση με χρωμογόνα υλικά καλλιέργειας

Η ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες μπορεί να γίνει με τη χρήση ειδικών θρεπτικών υλικών που περιέχουν δείκτες. Οι αποικίες των μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες διαχωρίζονται λόγω του διαφορετικού τους χρώματος. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες επιτήρησης χωρίς ωστόσο να έχει γίνει συστηματική εκτίμηση της αξιοπιστίας τους. Δύο τουλάχιστον εκλεκτικά υλικά καλλιέργειας είναι διαθέσιμα (CHROMagar –KPC, Brilliance CRE agar) (Παναγιωτακοπούλου, 2013).

### B. Βιοχημικές μέθοδοι

#### i. Ανίχνευση καρβαπενεμάσης με φασματοφωτομετρία και φασματομετρία μάζας

Η φασματοφωτομετρία χρησιμοποιείται για την μέτρηση της δραστηριότητας καρβαπενεμάσης και θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης από έναν ανθεκτικό στις καρβαπενέμες μικροοργανισμό. Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα ενζύμων και μία καρβαπενέμη. Η υδρόλυση των καρβαπενεμών παρουσία ή όχι των ανασταλτών (EDTA για τα MBL, ταζομπακτάμη ή κλαβουλανικό για τα KPC) μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με τον τύπο του ενζύμου. Η μέθοδος θεωρείται ότι έχει 100% ευαισθησία και 98.5% ειδικότητα για την ανίχνευση δραστηριότητας καρβαπενεμάσης (Bernabeu, Poirel, & Nordmann, 2012), ωστόσο είναι αρκετά χρονοβόρα και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό και ακριβό εξοπλισμό (Dortet et al., 2014). Η τεχνολογία MALDI-TOF φασματομετρία μάζας (Matrix-assisted laser desorption/ionization Mass Spectrometry) έχει βρεθεί ότι είναι μία χρήσιμη τεχνική για την ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης εντός λίγων ωρών (Burekhardt & Zimmermann, 2011; Hrabak, Walkova, Studentova, Chudackova, & Bergerova, 2011). Η χρήση της περιορίζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια με ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό.

#### ii. Χρωματομετρικές μέθοδοι

Η δοκιμασία Carba NP έχει φανεί ότι έχει αξιόλογα αποτελέσματα ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση δραστηριότητας καρβαπενεμάσης. Η αρχή

λειτουργίας της στηρίζεται στην ανίχνευση της υδρόλυσης της ιμιπενέμης μέσω αλλαγής στο χρώμα ενός δείκτη pH. Η συγκεκριμένη δοκιμασία έχει 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα για την ανίχνευση οποιουδήποτε τύπου καρβαπενεμάσης που παράγεται από Εντεροβακτηριακά, συμπεριλαμβανομένων και στελεχών που παράγουν NDM (P. Nordmann, Poirel, & Dortet, 2012; S. Vasoo et al., 2013), η οποία ωστόσο μειώνεται για στελέχη που παράγουν OXA-48 (Comrain et al., 2016; P. D. Tamma et al., 2017). Η εμπορική παραλλαγή της μεθόδου έχει αποδειχθεί ικανοποιητική για την ανίχνευση καρβαπενεμάσης (L. Poirel & Nordmann, 2015).

### Γ. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης γονιδίων καρβαπενεμασών

Η εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), όπως και η πολλαπλή (multiplex) και η πραγματικού χρόνου PCR (real-time PCR) θεωρείται ως μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών (P. Nordmann, Naas, & Poirel, 2011). Από το 2006 έως το 2012, τα συστήματα multiple real-time PCR εγκαταστάθηκαν για τη γρήγορη ανίχνευση των περισσότερων καρβαπενεμασών όπως KPC, OXA-48, VIM, IMP και NDM (X. Cui, H. Zhang, & H. Du, 2019). Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί πολλές τροποποιημένες μέθοδοι για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που προέκυπταν από την ποικιλομορφία των OXA-τύπου καρβαπενεμασών και την αδυναμία ανίχνευσής τους μέσω φαινοτυπικών μεθόδων (Hemarajata, Yang, Hindler, & Humphries, 2015). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία επιτρέπει την ανίχνευση των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες απευθείας από κλινικά δείγματα (Miriagou et al., 2010). Μία σημαντική αδυναμία των μεθόδων αυτών είναι ο περιορισμός της εφαρμογής τους για ανίχνευση προκαθορισμένων γονιδίων, με συνέπεια να μην γίνεται εφικτή η ανίχνευση νέων τύπων γονιδίων καρβαπενεμασών.

Πέραν των μεθόδων που προαναφέρθηκαν, έχουν αναπτυχθεί και ορισμένες άλλες μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση CPE, όπως τεχνικές βασισμένες στον υβριδισμό με χρήση μικροσυστοιχιών DNA (DNA microarrays), ενώ η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών είναι η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole genome sequencing, WGS). Κατά τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μία ταχεία και αποτελεσματική ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος, χωρίς την χρήση βακτηριακών κλώνων και παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τους τύπους των στελεχών. Επιπλέον, μπορούν να αναγνωριστούν και άλλοι μηχανισμοί αντοχής που δεν

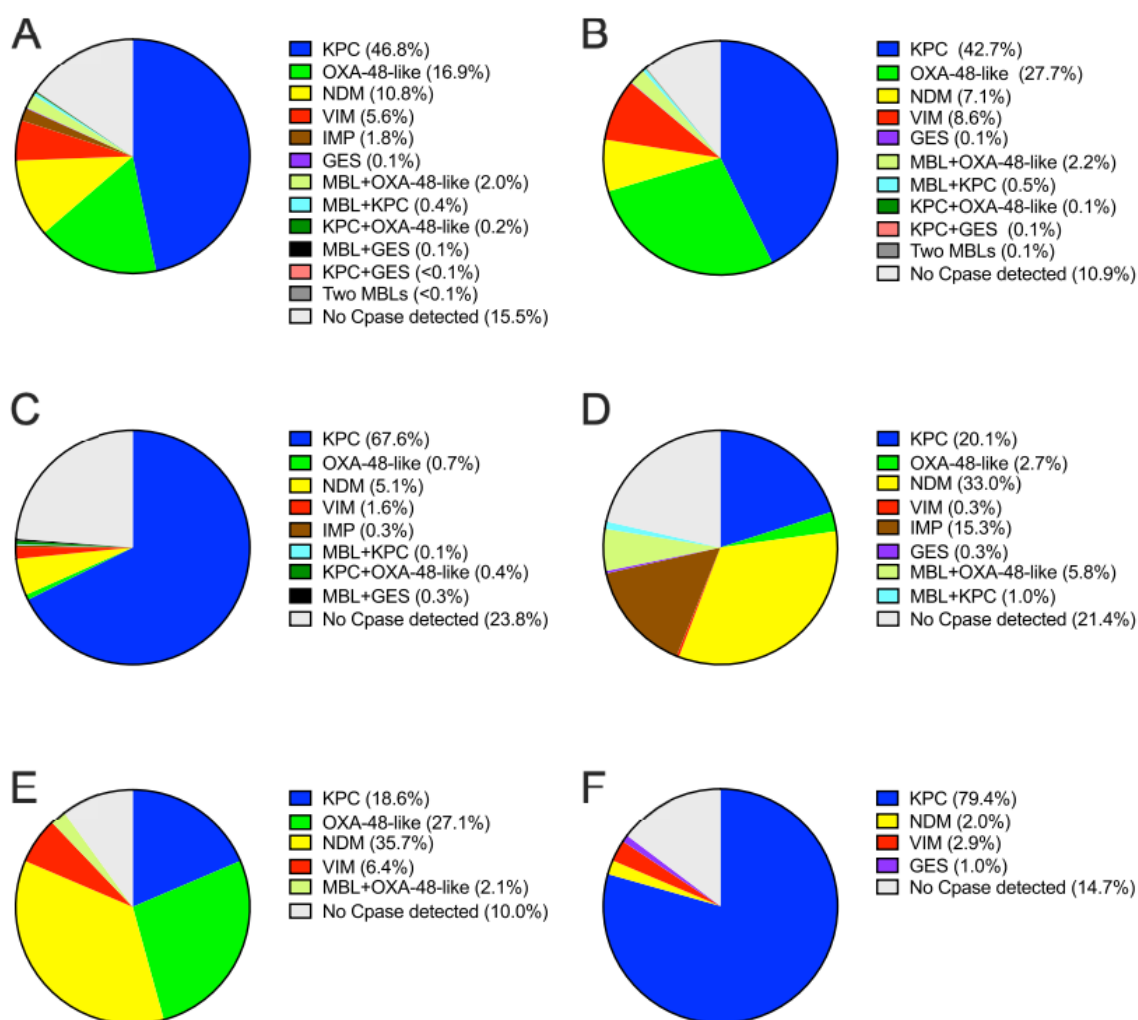
γίνονται εύκολα αναγνωρίσιμοι με τις φαινοτυπικές μεθόδους π.χ. μεταλλάξεις πορίνης και τύποι γονιδίων αντοχής που μεταφέρονται με πλασμίδια (Al-Zahrani, 2018; Κουπίδου, 2019). Στον **πίνακα 4** περιγράφονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων ανίχνευσης καρβαπενεμασών σε Εντεροβακτηριακά.

**Πίνακας 4:** Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των συνήθων μεθόδων ανίχνευσης καρβαπενεμασών σε Εντεροβακτηριακά. Προσαρμογή από (Xiaoayan Cui, Haifang Zhang, & Hong Du, 2019)

Μέθοδος ανίχνευσης	Πλεονεκτήματα	Περιορισμοί
<b>Modified Hodge test (MHT)</b>	1) Ανιχνεύει την KPC 2) Απλή και φθηνή μέθοδος	1) Ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά 2) Ανεπαρκής για τα MBL 3) Χρονοβόρα
<b>Χρωματομετρικές μέθοδοι</b>	1) Ανιχνεύει την KPC και τις περισσότερες MBLs 2) Απλή και φθηνή μέθοδος	1) Ανεπαρκής για τις OXA-48 2) Συγκεκριμένα αντιδραστήρια 3) Επιμολύνσεις
<b>Τροποποιημένη δοκιμασία απενεργοποίησης καρβαπενέμης (mCIM)</b>	1) Ανιχνεύει όλες τις καρβαπενεμάσες 2) Σαφή κριτήρια αξιολόγησης 3) Απλή και cost-effective	1) Χρονοβόρα
<b>Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι</b>	1) Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 2) Γρήγορη 3) Απλή και φθηνή	1) Εξοπλισμός (φασματοφωτόμετρο) 2) Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες 3) Όχι συγκεκριμένο κατόφλι 4) Μικρό δείγμα
<b>Μέθοδοι βασισμένες στη MALDI-TOF</b>	1) Ανιχνεύει την KPC και NDM 2) Γρήγορη 3) Εύκολη εφαρμογή	1) Ανεπαρκής για OXA-48 2) Όχι σαφές πρωτόκολλο 3) Ακριβός εξοπλισμός
<b>Μοριακές μέθοδοι</b>	1) Gold standards 2) Ανιχνεύει τα γονίδια όλων των καρβαπενεμασών 3) Γρήγορη	1) Υψηλές τεχνικές απαιτήσεις 2) Ανεπαρκής για την έκφραση των γονιδίων 3) Υψηλό κόστος

## 5. Επιδημιολογία των CPE

Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά αποτελούν σημαντικά παθογόνα παγκοσμίως και σχετίζονται με σημαντική νοσηρότητα και υψηλή θνητότητα. Ο πιο σημαντικός μηχανισμός αντοχής των στελεχών αυτών στις καρβαπενέμες αποτελεί η παραγωγή καρβαπενεμασών. Ωστόσο, σε περιοχές του πλανήτη όπως η η λατινική Αμερική και η Ασία, ένα σημαντικό ποσοστό CRE που φθάνει το 25% δεν εμφανίζει αντοχή με μηχανισμό παραγωγής καρβαπενεμάσης. Στην Ευρώπη τα ποσοστά αυτού του τύπου των CRE είναι χαμηλά και στην Ελλάδα απομονώνονται σε εξίσου χαμηλές συχνότητες (**εικόνα 20**) (Kazmierczak, Karlowsky, de Jonge, Stone, & Sahm, 2021).



**Εικόνα 20:** Επιδημιολογία των μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες που ανιχνεύονται σε μη-ευαίσθητα στη μεροπενέμη στελέχη Εντεροβακτηριακών. Συλλογή ως μέρος του παγκόσμιου προγράμματος επιτήρησης, 2012-2017. Α. Σύνολο, Β. Ευρώπη, C. Λατινική Αμερική, D. Ασία, Νότιος Ειρηνικός, E. Μέση Ανατολή, Αφρική, F. Βόρειος Αμερική (Kazmierczak et al., 2021).

Τα CRE που παράγουν καρβαπενεμάσες (Carbapenemase-producing *Enterobacterales*, CPE) και φέρουν γονίδια αντοχής κωδικοποιούμενα από πλασμίδια εύκολα διασπειρόμενα μεταξύ των ειδών αναδύθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990 (Queenan & Bush, 2007). Η κυρίαρχη καρβαπενεμάση που παράγεται από τα CPE παγκοσμίως είναι η *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *bla*<sub>KPC</sub> (Munoz-Price et al., 2013). Από την αρχική της αναγνώριση και μετά, η καρβαπενεμάση KPC έχει ανιχνευθεί και σε άλλους οργανισμούς πέρα από την *K. pneumoniae*, συμπεριλαμβανομένων των *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas putida* (Bennett, Herrera, Lewis, Wickes, & Jorgensen, 2009; Queenan & Bush, 2007). Άλλες καρβαπενεμάσες στα Εντεροβακτηριακά, οι οποίες έχουν συσχετισθεί με επιδημίες συμπεριλαμβάνουν τα ένζυμα Verona integron-encoded metallo-β-lactamase (VIM), New Delhi metallo-b-lactamase (NDM), Imipenemase (IMP) metallo-b-lactamase και Oxacillinase-48-type (OXA-48) (Canton et al., 2012).

Τον Απρίλιο 2016 μόνο σε δύο πολιτείες των ΗΠΑ δεν είχε αναφερθεί η ανίχνευση CRE που παράγουν KPC. Συνολικά είχαν αναγνωρισθεί 157 ασθενείς με NDM, 61 ασθενείς με OXA-48, 17 ασθενείς με VIM και 10 ασθενείς με IMP (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016; S. S. Richter & Marchaim, 2017). Οι αριθμοί αυτοί δεν αποτελούν παρά μόνο την κορυφή του παγόβουνου. Στον **πίνακα 5** συνοψίζονται οι περιοχές όπου είναι ενδημικές οι πιο σημαντικές καρβαπενεμάσες που κωδικοποιούνται από πλασμίδια.

**Πίνακας 5:** Κυρίαρχες καρβαπενεμάσες κωδικοποιούμενες από πλασμίδια και ενδημικές περιοχές (S. S. Richter & Marchaim, 2017)

Molecular Class	Functional Group	Enzyme	Endemic region
A <sup>a</sup>	2f	KPC	Argentina, China, Colombia, Greece, Israel, Italy, North America, Poland
B <sup>b</sup>	3	GES	Brazil
		NDM	China, India, Kenya
		IMP	China, Greece, Japan, India
		VIM	Brazil, France, Germany, Greece, India, Ireland, Italy, Japan, Lebanon, Poland, Portugal, UK
D <sup>a</sup>	2d	OXA	Africa, Belgium, Canada, Germany, Israel, Lebanon, Middle East, Morocco, Switzerland, Turkey

**Σημείωση:** KPC-Klebsiella pneumoniae καρβαπενεμάση; GES-Guiana extended spectrum; NDM -New Delhi metallo-β-lactamase, IMP-active on imipenem; VIM-Verona integron-encoded metallo-β-lactamase; GIM-German imipenemase; SPM-Sao Paulo metallo-β-lactamase; OXA-oxacillin-hydrolyzing.

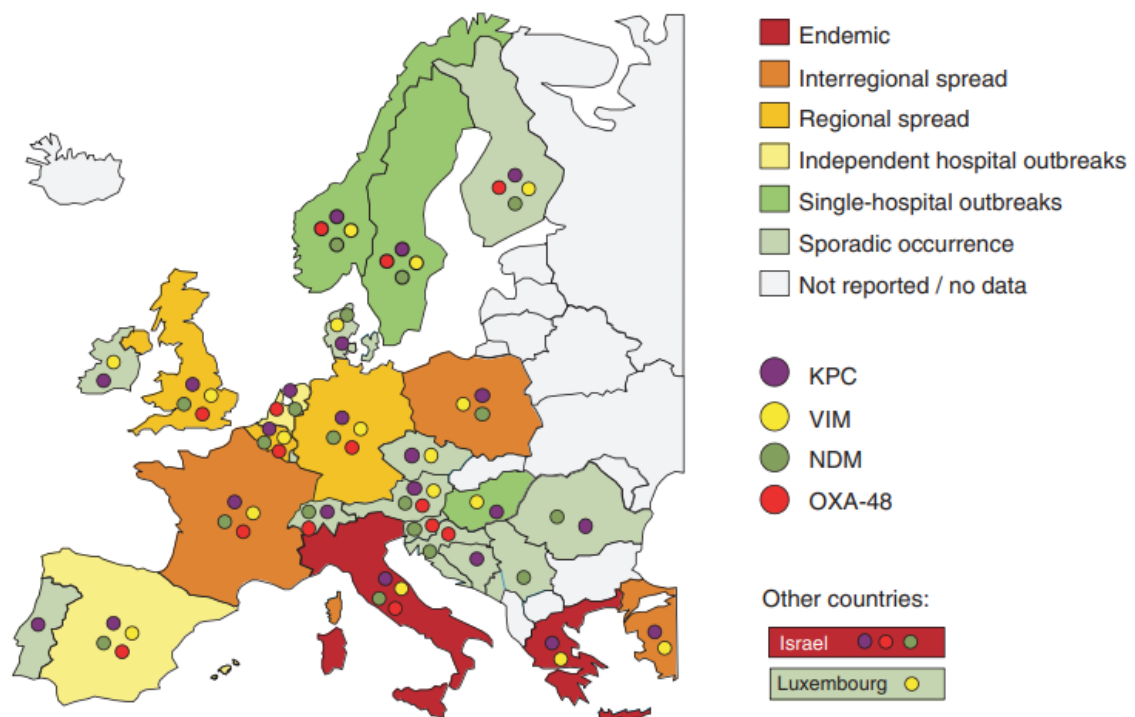
<sup>a</sup> Οι τάξης A και D β-λακταμάσες έχουν σερίνη στο ενεργό κέντρο και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ

<sup>b</sup> Οι τάξης B β-λακταμάσες (μεταλλο-ένζυμα) χρησιμοποιούν ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο και αναστέλλονται από το EDTA

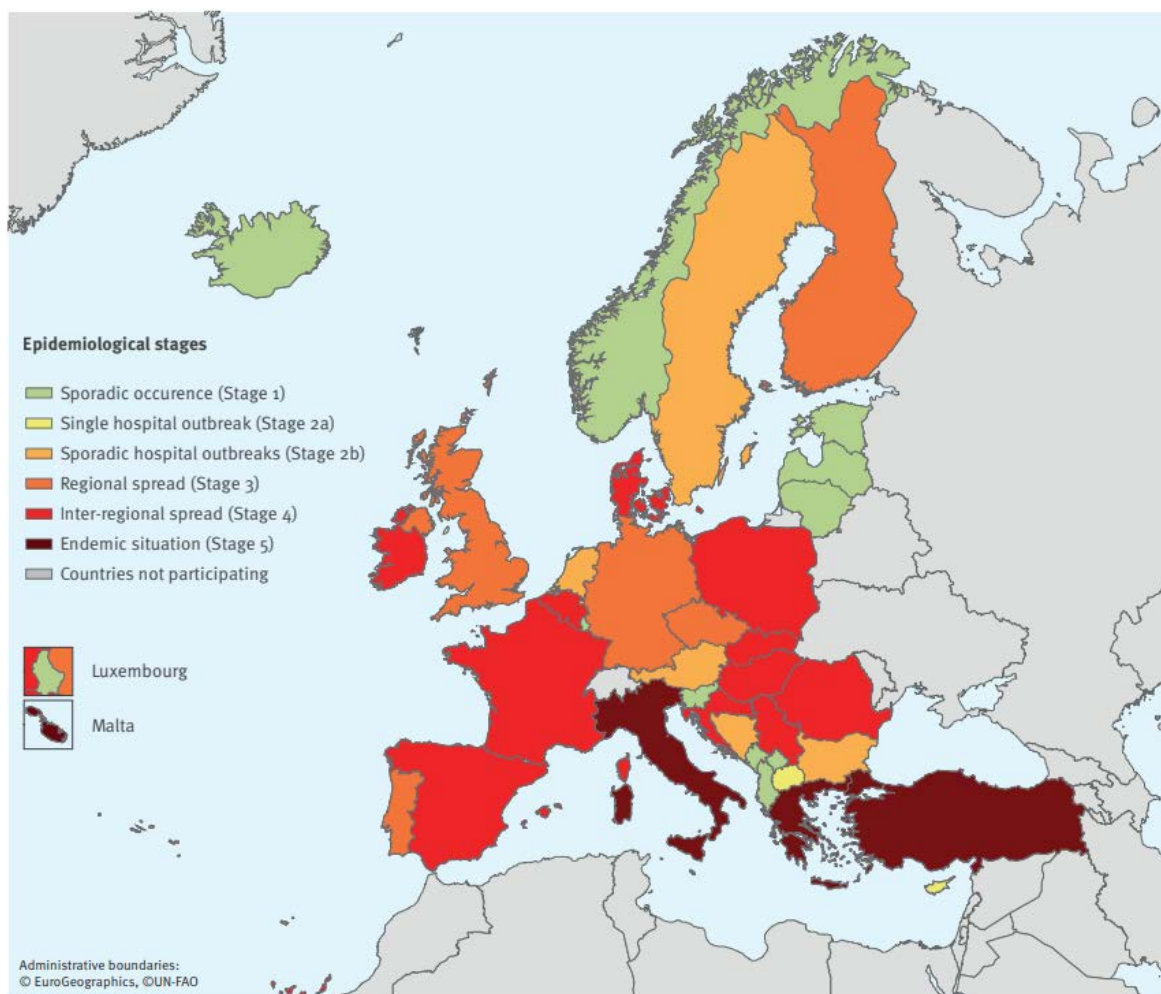
Εντός μίας δεκαετίας, μία τοπική συρροή κρουσμάτων CRE που παράγαγαν KPC διεσπάρη σε παγκόσμιο επίπεδο μέσω ενός τρανσποζονίου (Tn4401) (Munoz-Price et al., 2013; M. J. Schwaber & Carmeli, 2008). Ενώ οι τοπικές επιδημίες εμφανίζονταν αρχικά σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, στη συνέχεια ακολουθήσε η διασπορά των μικροβίων σε εγκαταστάσεις μακροχρόνιας φροντίδας υγείας (Ben-David et al., 2011; Marchaim et al., 2011). Σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, τα CRE απομονώνονται πλέον και στην κοινότητα, χωρίς να υπάρχει ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε περιβάλλον περίθαλψης (Abdallah et al., 2015; M. J. Schwaber & Carmeli, 2008). Οι στρατηγικές πρόληψης θα πρέπει να στοχεύουν λοιπόν όλο το φάσμα του συνεχούς της ιατρικής φροντίδας (Marchaim, Chopra, Bogan, et al., 2012). Παράδειγμα εφαρμογής επιτυχούς στρατηγικής ελέγχου της διασποράς των CRE κατά τη διάρκεια μίας πανδημίας αποτέλεσε το Ισραήλ, όπου επιτεύχθηκε μείωση στη διασπορά, μόνο εφόσον διευρύνθηκε το σχέδιο πρόληψης συμπεριλαμβάνοντας και τις εγκαταστάσεις μακροχρόνιας περίθαλψης (M. J. Schwaber & Carmeli, 2014; Mitchell J Schwaber et al., 2011).

Η παρουσία CRE έχει επιβεβαιωθεί και στις 37 ευρωπαϊκές χώρες που συμμετείχαν στην έρευνα EURGen-Net το 2018 (Brolund et al., 2019) με ποικίλο επιπολασμό. Σε πολλές χώρες, η συχνότητά τους παραμένει χαμηλή, με τις περισσότερες περιπτώσεις να αφορούν εισαγωγή στελεχών από άλλες χώρες, ακολουθούμενη από περιστασιακές επιδημίες. Σε κάποιες χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (καθώς και η Ρουμανία, Ιταλία, Κύπρος)

έχει παρατηρηθεί μαζική διασπορά CRE, οδηγώντας σε μία κατάσταση ενδημίας, ενώ σε άλλες (π.χ. Ισπανία, Πορτογαλία, Βουλγαρία) η συχνότητα παραμένει χαμηλή αλλά με τάση αύξησης. Η ευρεία επιδημιολογική ποικιλομορφία που παρουσιάζεται μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών δεν αφορά μόνο στον επιπολασμό των ανθεκτικών στελεχών αλλά και τους διαφορετικούς τύπους καρβαπενεμάσης μεταξύ των CPE (Ambretti et al., 2019; Grundmann et al., 2017). Στις εικόνες 21 και 22 παρουσιάζεται η επιδημιολογική κατάσταση όσον αφορά τα CPE στην Ευρώπη το 2012 και το 2018 αντίστοιχα ,και οι πιο συνήθεις τύποι καρβαπενεμάσης ανά χώρα.



**Εικόνα 21:** Η κατάσταση στην Ευρώπη όσον αφορά τα CPE και οι τύποι καρβαπενεμάσης σε διάφορες χώρες ή γεωγραφικές περιοχές ως τον Ιανουάριο 2012 (Canton et al., 2012).



**Εικόνα 22:** Επιδημιολογική κατάσταση των CPE, αξιολόγηση από ειδικούς σε 37 ευρωπαϊκές χώρες, Ιούλιος 2018. (Brolund et al., 2019)

Όσον αφορά τη συχνότητα των CPE στη χώρα μας, η Ελλάδα αποτελεί την ευρωπαϊκή χώρα με την υψηλότερη επίπτωση τέτοιων στελεχών και θεωρείται το επίκεντρο της διασποράς Εντεροβακτηριακών (κυρίως *K.pneumoniae*) που παράγουν VIM σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Kassis-Chikhani et al., 2006). Αρχικά τα CPE αφορούσαν μόνο ασθενείς σε ΜΕΘ, ωστόσο πλέον έχουν εξαπλωθεί σε διάφορες εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης, καθώς και σε μονάδες μακροχρόνιας νοσηλείας. Αναφορές από τη βάση δεδομένων του ECDC δείχνουν ότι ως το 66.3% των διεισδυτικών στελεχών *K.pneumoniae* στην Ελλάδα το 2020 εμφάνιζαν αντίσταση στις καρβαπενέμες (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020). Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα για διασπορά στην κοινότητα.



Η εξάπλωση των VIM καρβαπενεμασών στη χώρα και στην Ευρώπη ξεκίνησε το 2001, με την απομόνωση ενός στελέχους *E.Coli*, που έφερε ένα αυτομεταφερόμενο πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για τη VIM-1 (Vivi Miriagou, Eva Tzelepi, Dimitra Gianneli, & Leonidas S Tzouvelekis, 2003) και στη συνέχεια την απομόνωση στελεχών *E.Coli* που παρήγαγαν VIM στην Κρήτη (Scoulica, Neonakis, Gikas, & Tselentis, 2004). Ακολούθησε και η απομόνωση *K.pneumoniae* παράγουσας VIM σε νοσοκομεία της Αθήνας (Giakkouri et al., 2003). Έκτοτε έχουν αναφερθεί τοπικές επιδημίες διάφορων κλώνων *K.pneumoniae* παράγουσας VIM σε νοσοκομεία σε όλη τη χώρα (Ikonomidis et al., 2005). Στελέχη *K.pneumoniae* παραγόντων KPC-2 απομονώθηκαν στη χώρα για πρώτη φορά το 2008, και έκτοτε έχουν διασπαρεί οδηγώντας σε μία επιδημία σε όλη την επικράτεια (Athanasios Tsakris et al., 2008), ενώ ο τύπος (ST)258 είναι ακόμα ο κυρίαρχος τύπος μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών (Samuelson et al., 2009). Αξίζει να αναφερθεί ότι πλέον υπάρχουν αναφορές κλώνων που εκφράζουν τόσο VIM όσο και KPC ένζυμα ενώ επιπλέον έχουν αναφερθεί και στελέχη ανθεκτικά στην κολιστίνη, καθώς και πανανθεκτικά (Panagiota Giakkouri et al., 2011; Kontopoulou et al., 2010; Spyros Pournaras et al., 2009). Τέλος, έχουν παρουσιαστεί και τοπικές επιδημίες από κλώνους *E.Coli* που παράγουν KPC-2 σε εγκαταστάσεις μακροχρόνιας περίθαλψης (Mavroidi et al., 2012).

Σύμφωνα με δεδομένα από απομονωθέντα στελέχη μεταξύ 2014-2018 από νοσοκομεία ανά την ελληνική επικράτεια, η KPC-2 αποτελεί την κυρίαρχη καρβαπενεμάση μεταξύ των Εντεροβακτηριακών ακολουθούμενη από τα μεταλλοένζυμα NDM και VIM, ενώ η OXA-48 καταλαμβάνει την 4<sup>η</sup> θέση. Μεταξύ στελεχών *K.pneumoniae*, η KPC-2 είναι η συχνότερα απομονούμενη καρβαπενεμάση, ακολουθούμενη από την NDM, ενώ μεταξύ στελεχών *Enterobacter*, *E.coli*, και άλλων ειδών κυριαρχεί η VIM. Στο 4% των δειγμάτων απομονώνονται ταυτόχρονα περισσότερες από μία καρβαπενεμάσες, ενώ στο 7% η αντίσταση στις καρβαπενέμες αποδίδεται σε άλλους μηχανισμούς, κυρίως την παραγωγή ESBL ή AmpC μαζί με απώλεια πορινών. Το 70% των στελεχών που απομονώθηκαν παρουσίαζαν πολυανθεκτικό φαινότυπο, με ταυτόχρονη αντίσταση στις αμινογλυκοσίδες και της κινολόνες (Tryfinopoulou et al., 2019).

## 6. Αποικισμός από CRE

### 6.1. Ορισμός αποικισμένου ασθενούς

Ως αποικισμένος ορίζεται ένας ασθενής, από κλινικό δείγμα του οποίου απομονώνεται Εντεροβακτηριακό στέλεχος ανθεκτικό στις καρβαπενέμες (Carbapenem resistant *Enterobacteriales*, CRE), χωρίς ο ασθενής να παρουσιάζει ταυτόχρονα συμπτώματα λοίμωξης (E. Tacconelli et al., 2014). Οι ιδανικές θέσεις ελέγχου αποικισμού με πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριακά έχουν μελετηθεί σε πολλές έρευνες. Μεταξύ αυτών η πιο αξιόπιστη θέση έχει βρεθεί ότι είναι η περιοχή του ορθού και η περιοριστική περιοχή (Buehlmann, Fankhauser, Laffer, Bregenzer, & Widmer, 2010; Wiener-Well et al., 2010), δεδομένου ότι ο αποικισμός από CRE αφορά κυρίως τον γαστρεντερικό σωλήνα. Άλλες θέσεις απομόνωσης περιλαμβάνουν τη βουβωνική χώρα, τις μασχάλες, το ουροποιητικό και το αναπνευστικό σύστημα (Schechner et al., 2011; Thurlow et al., 2013; Σπυριδοπούλου, 2020). Για τον ορισμό του αποικισμού απαιτείται λοιπόν η συνύπαρξη δύο κριτηρίων:

- Απουσία κλινικών σημείων λοίμωξης
- Μικροβιολογική τεκμηρίωση με απομόνωση του πολυανθεκτικού μικροοργανισμού από χλωρίδες του ασθενούς ή άλλα δείγματα, τα οποία δεν κατοχυρώνουν παρουσία λοίμωξης (π.χ. ενδαγγειακοί καθετήρες)

### 6.2. Μηχανισμοί μετάδοσης

Οι βασικοί δύο μηχανισμοί αποικισμού με CRE που παρατηρούνται σε περιβάλλον υγειονομικής περίθαλψης είναι η μετάδοση από ασθενή σε ασθενή (δηλ., άμεσα από άλλον ασθενή, μέσω του προσωπικού, μέσω του κοντινού περιβάλλοντος, ή μέσω κοινόχρηστου εξοπλισμού) και η ανάδυση της αντίστασης, όπου τα ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη ενός ασθενή υφίστανται γενετικές μεταλλάξεις (Christopher Bogan & Marchaim, 2013). Ως συνηθέστερη πηγή μετάδοσης πολυανθεκτικών στελεχών σε ασθενείς θεωρείται η επαφή με άλλους αποικισμένους ασθενείς (Mathers et al., 2020). Στους ενδιάμεσους μεσολαβητές της μετάδοσης περιλαμβάνονται τα μολυσμένα χέρια του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού, το άψυχο περιβάλλον και ο εξοπλισμός, καθώς και οι επισκέπτες των ασθενών. Τα παραπάνω θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στην προσπάθεια ελέγχου των πολυανθεκτικών

νοσοκομειακών παθογόνων. Επιπλέον, καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση παίζει και η δυναμική διασποράς των ίδιων των παθογόνων, όπως και παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τον ίδιο τον ασθενή (E. Tacconelli et al., 2014). Μελέτες δείχνουν την τάση που παρουσιάζει η *K.pneumoniae* να εξαπλώνεται στα νοσηλευτικά ιδρύματα και να προκαλεί νοσοκομειακές επιδημίες (Rodriguez-Bano & Pascual, 2008), με τη μετάδοση μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας να αποτελεί τη σημαντικότερη οδό διασποράς. Η μόλυνση των χεριών θεωρείται ότι συμβαίνει κυρίως με την επαφή με αποικισμένους ασθενείς αλλά και με περιβαλλοντικές πηγές μόλυνσης (Dashti, Jadaon, Goma, Noronha, & Udo, 2010; Gastmeier, Groneberg, Weist, & Ruden, 2003; A. D. Harris et al., 2007).

### **6.3. Ο ρόλος της ενεργού επιτήρησης αποικισμών**

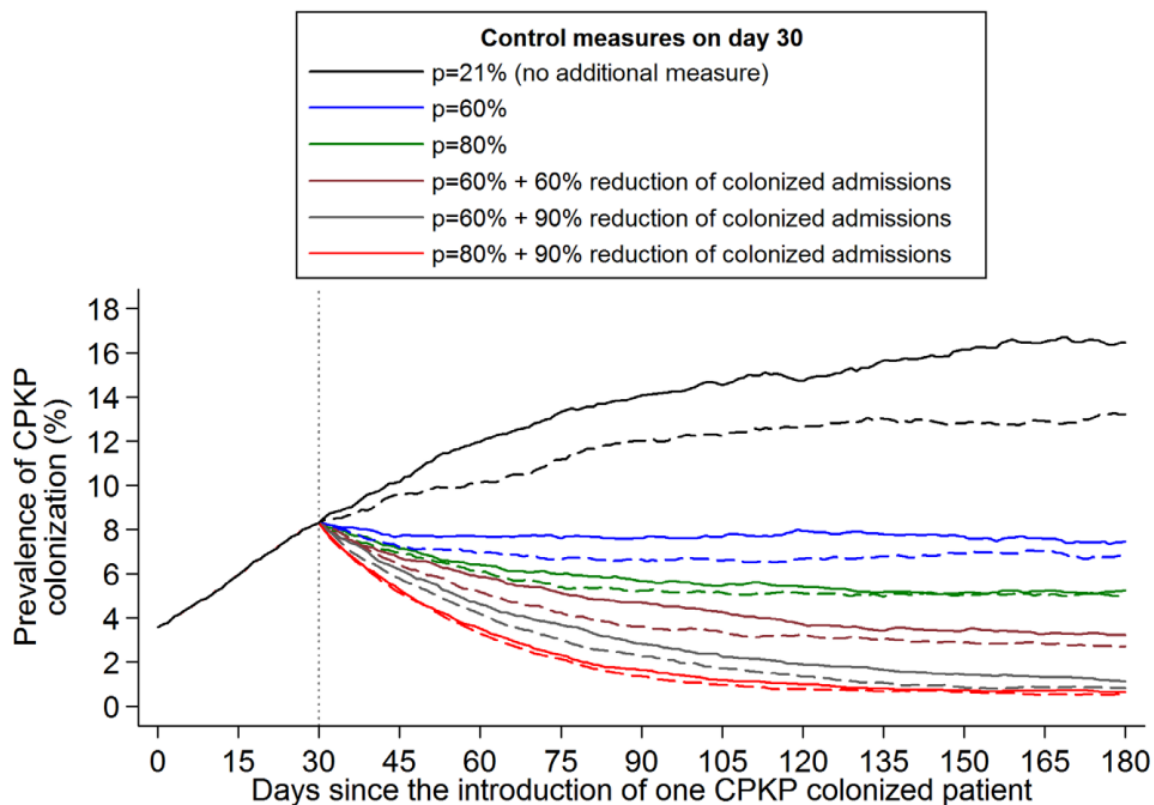
Τα μέτρα περιορισμού της ενδονοσοκομειακής μετάδοσης πολυανθεκτικών μικροβίων συμπεριλαμβάνουν: 1) την υγιεινή των χεριών, 2) τις προφυλάξεις επαφής, 3) το φυσικό διαχωρισμό ασθενών (απομόνωση, συν-νοσηλεία) και το διαχωρισμό προσωπικού (nursing - staff cohorting / dedicated nursing), 4) την απολύμανση του περιβάλλοντος, 5) την εφαρμογή πρωτοκόλλων αποαποικισμού/μείωσης βακτηριακού φορτίου (μπάνιο με αντισηπτικούς παράγοντες), 6) την ενεργητική επιτήρηση αποικισμών και ιδιαιτέρως την επιτήρηση ασθενών με CRE (λοίμωξη ή αποικισμό), 7) την παρακολούθηση ασθενών που ήρθαν σε επαφή με φορέα και 8) την εξαιρετικής σημασίας εφαρμογή προγραμμάτων ανίχνευσης για τον εντοπισμό πιθανών ασυμπτωματικών φορέων (Barnes, Morgan, Harris, Carling, & Thom, 2014; Anthony D Harris et al., 2007).

Οι καλλιέργειες ορθικών δειγμάτων για έλεγχο αποικισμού αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για τον περιορισμό της διασποράς των λοιμώξεων, όχι μόνο κατά τη διάρκεια επιδημιών αλλά και ως μέτρο ρουτίνας σε ενδημικές περιοχές για CRE (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2014; M. J. Schwaber & Carmeli, 2014). Ως ενδημικό ορίζεται ένα περιβάλλον, όπου υπάρχουν συνεχείς προκλήσεις από την εισαγωγή αποικισμένων ασθενών ή ασθενών με λοίμωξη από πολυανθεκτικούς οργανισμούς (E. Tacconelli et al., 2014). Ο έλεγχος αποικισμού των ασθενών για προσδιορισμό των ασυμπτωματικών φορέων και η εγκατάσταση μέτρων περιορισμού επαφής, πέραν του ότι μειώνει την μετάδοση από ασθενή σε ασθενή και την πίεση αποικισμού μπορεί να βελτιώσει την έκβαση της νοσηλείας των ασθενών, μειώνοντας την καθυστέρηση στην έναρξη της κατάλληλης αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας (C. Bogan et al., 2014). Επιπλέον, η ενεργός

επιτήρηση μέσω καλλιιεργειών αποικισμού μπορεί να εκτιμήσει καλύτερα την πίεση αποικισμού σε σχέση με καλλιέργειες που λαμβάνονται μόνο από κλινικά δείγματα (Bonten, 2012; Marchaim et al., 2011).

Δεδομένου ότι ο αποικισμός με CRE σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από CRE, η γνώση του αν ένας ασθενής είναι αποικισμένος βοηθά όχι μόνο στον έλεγχο διασποράς λοιμώξεων αλλά και στην επιμελητεία της ορθής χρήσης αντιβιοτικών (antimicrobial stewardship). Συγκεκριμένα, σε ορισμένες κατηγορίες ασθενών οι οποίοι κινδυνεύουν από διεισδυτικές λοιμώξεις (π.χ. ουδετεροπενικοί ασθενείς), η γνώση της κατάστασης αποικισμού μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή της κατάλληλης εμπειρικής χημειοθεραπείας, καλύπτοντας για το παθογόνο του αποικισμού σε περίπτωση σήψης. Πέραν αυτού, η γνώση του μηχανισμού αντοχής του στελέχους που αποικίζει τον ασθενή είναι εξαιρετικά σημαντική, δεδομένου του διαφορετικού φάσματος των αντι-CRE παραγόντων. Παραδείγματος χάριν, η εμπειρική χρήση κεφαταζιδίμης-αβιμπακτάμης θα μπορούσε να θεωρηθεί πιθανή επιλογή στην περίπτωση ενός στελέχους CPE που παράγει KPC αλλά όχι στην περίπτωση ενός CPE που παράγει μεταλλο-β-λακταμάση (Wright, Bonomo, & Paterson, 2017). Η καθυστέρηση στην έναρξη κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής είναι ο ισχυρότερος τροποποιήσιμος ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου θνητότητας στη σοβαρή σήψη γενικά, και ειδικότερα στις λοιμώξεις από CRE (Marchaim et al., 2011; M. Paul et al., 2010).

Η σημασία της επιτήρησης αποικισμών σε ένα ενδημικό περιβάλλον έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία. Στην **εικόνα 24** υπολογίζεται η επίδραση των μέτρων ελέγχου λοιμώξεων στον επιπολασμό από *CPKp* σε χειρουργική κλινική μέσω μοντέλου προσομοίωσης (Sypsa et al., 2012). Γίνεται εμφανές ότι τη μεγαλύτερη μείωση στη συχνότητα των αποικισμένων κατορθώνει η εφαρμογή ενεργού επιτήρησης αποικισμών με ακόλουθη εφαρμογή μέτρων ελέγχου διασποράς (προφυλάξεις επαφής, απομόνωση). Αντίθετα, η συμμόρφωση με τα μέτρα υγιεινής χεριών φτάνει σε ένα μέγιστο ποσοστό 80%, το οποίο δεν αντιστοιχεί σε συρρίκνωση των φορέων. Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αιματολογική κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου εφαρμόστηκε δέσμη μέτρων που συμπεριέλαβε την ενεργό επιτήρηση αποικισμών, με αποτέλεσμα την εκμηδένιση των βακτηριαμιών από *CPKp* κατά την περίοδο της παρέμβασης (Spyridopoulou et al., 2020).



**Εικόνα 23: Επίδραση μέτρων ελέγχου λοιμώξεων στον επιπολασμό του αποικισμού από CPKP σε ένα ενδημικό περιβάλλον.** Ένας αποικισμένος με CPKP ασθενής εισέρχεται στη χειρουργική κλινική την ημέρα 0 και το μόνο μέτρο ελέγχου που εφαρμόζεται κατά τις πρώτες 30 μέρες της νοσηλείας του είναι η συμμόρφωση με την υγιεινή χεριών ( $p = 21\%$ ). Έγινε προσομοίωση της επίδρασης των διαφόρων στρατηγικών ελέγχου λοιμώξεων που εφαρμόστηκαν από την ημέρα 30 και μετά στον επιπολασμό του αποικισμού με CPKP (παρουσιάζεται ο μέσος όρος 1,000 προσομοιώσεων). Τα σενάρια που αξιολογήθηκαν περιλαμβάνουν: 1. Κανένα άλλο πρόσθετο μέτρο (συμμόρφωση με την υγιεινή χεριών  $p = 21\%$ ), 2. αύξηση  $p$  στο 60%, 3. αύξηση  $p$  στο 80%, 4. αύξηση  $p$  στο 60% και μείωση του επιπολασμού του αποικισμού με CPKP στην εισαγωγή κατά 60% (μέσω ενεργής επιτήρησης και ακόλουθης απομόνωσης ή αυστηρές προφυλάξεις επαφής για τους θετικούς ασθενείς, 5. αύξηση  $p$  στο 60% και μείωση του επιπολασμού του αποικισμού από CPKP στην εισαγωγή κατά 90%, 6. αύξηση  $p$  στο 80% and μείωση του επιπολασμού του αποικισμού από CPKP στην εισαγωγή κατά 90%. Οι διακεκομμένες γραμμές (---) αντιστοιχούν στα σενάρια με προσθήκη 50% μείωσης στη διάρκεια χρήσης αντιβιοτικής αγωγής κατά τη νοσηλεία του ασθενή στη μονάδα (υποθέτοντας ένα σχετικό κίνδυνο σχετιζόμενο με τη χρήση αντιβιοτικών ίσο με 3 (Sypsa et al., 2012).

#### 6.4. Παράγοντες κινδύνου

Ο αποικισμός του γαστρεντερικού συστήματος των ασθενών είναι ο κύριος τρόπος ανάπτυξης λοίμωξης από πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριακά. Τα ποσοστά της εμφάνισης λοίμωξης μετά από αποικισμό με CRE κυμαίνονται στις διάφορες έρευνες από 7.6-44.4% (Lübbert et al., 2014; Pisney, Barron, Kassner, Havens, & Madinger, 2014) ενώ σε πρόσφατη μετα-ανάλυση, ο συνολικός κίνδυνος λοίμωξης από CRE μεταξύ των αποικισμένων ανήλθε στο 16.5% . Ως σήμερα, αρκετοί παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από CRE έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία, οι οποίοι ωστόσο μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με το βακτήριο αλλά και το ενζύμο που του προσδίδει ανθεκτικότητα. Οι περισσότερες από τις μελέτες αναζήτησης παραγόντων κινδύνου αποικισμού και λοίμωξης από CRE είναι αναδρομικού τύπου, μελέτες ασθενών-μαρτύρων ή κοορτής με μικρό μέγεθος δείγματος (Akova, Daikos, Tzouveleki, & Carmeli, 2012; Ben-David et al., 2011; A. Bhargava et al., 2014; Burillo, Munoz, & Bouza, 2019; Gasink, Edelstein, Lautenbach, Synnestvedt, & Fishman, 2009; Gregory et al., 2010; Perez, Pultz, Endimiani, Bonomo, & Donskey, 2011; S. S. Richter & Marchaim, 2017; M. J. Schwaber & Carmeli, 2008; M. J. Schwaber et al., 2008). Από τις μελέτες αυτές οι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετισθεί με υψηλότερη πιθανότητα αποικισμού από CRE είναι οι ακόλουθοι:

1. Προηγούμενη έκθεση σε αντιβιοτικά και κυρίως ιστορικό έκθεσης σε φθοριοκινολόνες και καρβαπενέμες
2. Χαμηλό επίπεδο λειτουργικότητας ή/και γνωστικής λειτουργίας, κλινοστατισμός
3. Πρόσφατη διαμονή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας, γηροκομείο
4. Κακοήθη νοσήματα
5. Πληθώρα συννοσηρότητας – υψηλό Charlson score
6. Ιστορικό μη χειρουργικών επεμβατικών διαδικασιών (ιδιαίτερως η τοποθέτηση καθετήρα χοληφόρων αγγείων)
7. Παρουσία ξένων σωμάτων
8. Παρατεταμένη διάρκεια προηγούμενης νοσηλείας
9. Ιστορικό μηχανικού αερισμού
10. Ιστορικό νοσηλείας σε ΜΕΘ
11. Ιστορικό νοσηλείας σε μονάδα φροντίδας μετά από νοσηλεία σε ΜΕΘ
12. Ιστορικό χειρουργικής επέμβασης
13. Συννοσηλεία σε θάλαμο με γνωστούς φορείς CRE
14. Αυξημένη επίπτωση γνωστών φορέων CRE στο θάλαμο

15. Αποικισμός ή λοίμωξη με άλλα ανθεκτικά παθογόνα, Εντεροβακτηριακά και μη (π.χ. *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*)
16. Χρήση πάνας – ακράτεια κοπράνων
17. Υψηλός βαθμός πίεσης αποικισμού στο περιβάλλον
18. Ύπαρξη τραυμάτων, ελκών κατακλίσεων
19. Ιστορικό πρόσφατου ταξιδιού ή νοσηλείας σε ενδημική περιοχή

Η μεγάλη ηλικία και η ανοσοκαταστολή παρουσιάζονται σε ορισμένες έρευνες ως παράγοντες κινδύνου για αποικισμό, ωστόσο φαίνεται ότι λειτουργούν κατά βάση ως συγχυτικοί παράγοντες (Marchaim, Chopra, Bhargava, et al., 2012; S. S. Richter & Marchaim, 2017). Το τυπικό παράδειγμα ενός στόχου των CRE είναι ένας ασθενής με μεγάλη συννοσηρότητα, με ιστορικό επαναλαμβανόμενων εισαγωγών σε νοσοκομεία, ίσως με μακροχρόνια νοσηλεία, ο οποίος έχει υποστεί παρεμβάσεις για τη διαχείριση της νόσου του. Συνεπώς, όσο πιο περίπλοκο είναι το μονοπάτι της περίθαλψης και όσο πιο μεγάλη η ευαλωτότητα του ασθενούς τόσο πιθανότερος είναι ο αποικισμός με CRE και η ακόλουθη διεσδυτική νόσος (Ambretti et al., 2019; Giannella et al., 2014).

Αξίζει να αναφερθεί ότι πάντα θα πρέπει να συνυπολογίζονται παράγοντες όπως το ιστορικό πρόσφατου ταξιδιού με νοσηλεία σε ενδημική περιοχή ή η μετανάστευση από τέτοιες περιοχές στην αρχική αξιολόγηση της πιθανότητας αποικισμού (Burillo et al., 2019). Για τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες και τις Η.Π.Α αυτή η συγκεκριμένη πληροφορία είναι εξαιρετικής σημασίας, ενώ αποτελεί και κατευθυντήρια οδηγία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, 2017, 2019), του CDC (National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases. Division of Healthcare Quality Promotion, 2015) και του ECDC (Magiorakos et al., 2017) για την προσαρμογή των στρατηγικών ελέγχου αποικισμού. Δεδομένου ότι η Ελλάδα αποτελεί ήδη ενδημική για CRE περιοχή, η οδηγία αυτή δεν έχει την ίδια βαρύτητα όσο για χώρες μη ενδημικές. Δεδομένης της ευρείας κινητικότητας των ανθρώπων τα τελευταία χρόνια, της ευκολίας των ταξιδιών και της αυξημένης μετανάστευσης, συνήθως από την ανατολή προς τη δύση ή από το νότο προς το βορρά, είναι σημαντική και για τον ελλαδικό χώρο η καταγραφή της προέλευσης των ασθενών και του ιστορικού πρόσφατων ταξιδιών και η αξιολόγησή τους ως πιθανών παραγόντων κινδύνου.

Ο έλεγχος αποικισμού με CRE μέσω λήψης ορθικών φορειών σε ασθενείς που εισάγονται σε τριτοβάθμια νοσοκομεία και ιδιαίτερος σε «ευαίσθητες» πτέρυγες έχει προταθεί από διάφορους φορείς (M. J. Schwaber & Carmeli, 2014), συμπεριλαμβανομένου

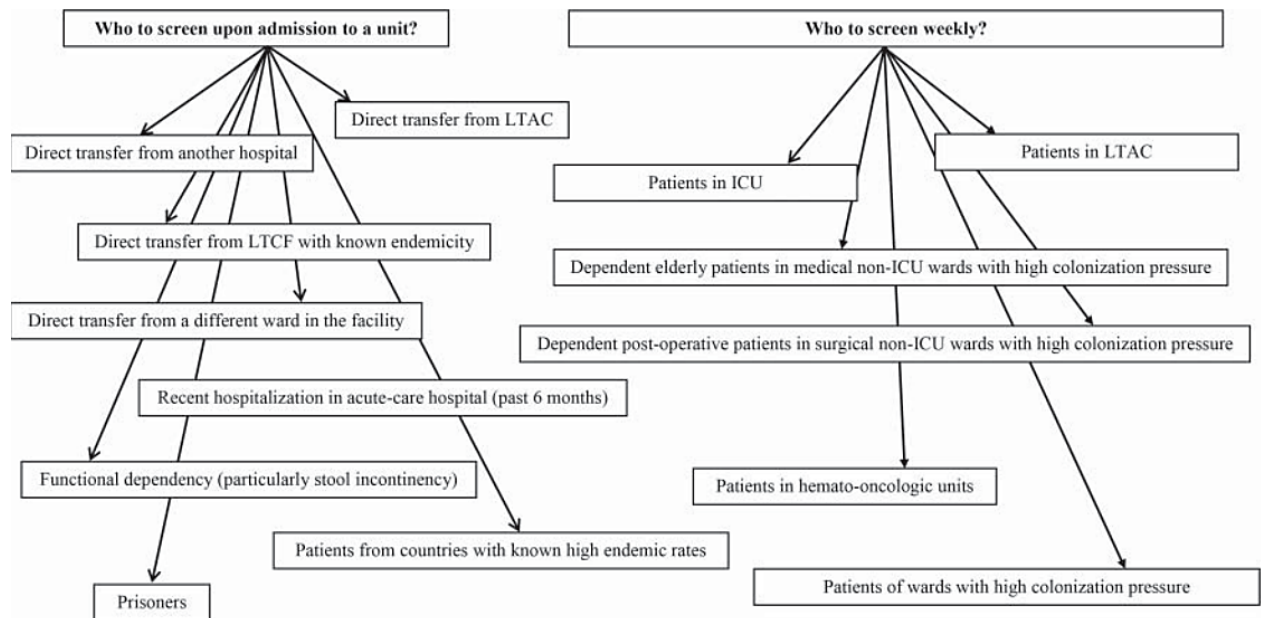
του CDC (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009), παρότι λείπουν προς το παρόν οι μελέτες ελέγχου αποτελεσματικότητας (S. S. Richter & Marchaim, 2017). Η χρήση του σημαντικού αυτού εργαλείου δεν περιορίζεται μόνο κατά τη διάρκεια επιδημιών, αλλά αποτελεί μέτρο ρουτίνας σε ενδημικά για CRE μέρη (M. J. Schwaber & Carmeli, 2014). Με βάση τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου, έχει δημιουργηθεί πληθώρα εθνικών και διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών γύρω από τη διαχείριση των CRE. Ωστόσο, κάποιες από αυτές δεν είναι επικαιροποιημένες, άλλες δεν αντικατοπτρίζουν την παρούσα επιδημιολογία και επιπλέον δεν δίνουν απαραίτητα ρεαλιστικές συμβουλές όσον αφορά στην ενεργό επιτήρηση αποικισμών με CRE σε χώρες με υψηλό επιπολασμό και περιορισμένους πόρους (Ambretti et al., 2019).

Στην πράξη, η απόφαση για το ποιό ασθενείς θα ελεγχθούν για αποικισμό εξατομικεύεται ανάλογα με την τοπική επιδημιολογία, το περιβάλλον στο οποίο αναφερόμαστε και τους διαθέσιμους πόρους. Για παράδειγμα στην Ιταλία, η οποία αποτελεί ενδημική για CRE χώρα, προτείνεται από το Υπουργείο Υγείας ο έλεγχος για αποικισμό σε όλους τους ασθενείς που έχουν έρθει σε επαφή με θετικούς για CRE ασθενείς, σε όσους ασθενείς εισάγονται στο νοσοκομείο και έχουν ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης από CRE, και σε όσους ασθενείς προέρχονται από ενδημικές περιοχές. Επιπλέον, προτείνεται ο έλεγχος σε όσους ασθενείς εισάγονται σε μονάδες αυξημένου κινδύνου, σε ασθενείς που μεταφέρονται από άλλο νοσοκομείο, έχουν ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας ή προέρχονται από κάποια εγκατάσταση μακροχρόνιας περίθαλψης (κέντρο αποκατάστασης, οίκος ευγηρίας κ.λ.π.) (Ambretti et al., 2019). Αντίστοιχα στο Ισραήλ, η θέσπιση και εφαρμογή εθνικών κατευθυντήριων οδηγιών το 2008 με παραίνεση προς όλες τις εγκαταστάσεις να εφαρμόσουν στρατηγική ελέγχου αποικισμών βοήθησε να καμφθεί η επιδημία που ξεκίνησε το 2006 (M. J. Schwaber & Carmeli, 2014). Πλέον στο Ισραήλ συνιστάται να γίνεται έλεγχος αποικισμού σε κάθε νέα εισαγωγή σε εγκαταστάσεις μακροχρόνιας περίθαλψης ασθενών που έχουν προέλθει από νοσοκομείο ή ασθενών από το σπίτι, αλλά με ιστορικό σημαντικής έκθεσης σε υγειονομικό περιβάλλον (Ashish Bhargava et al., 2014; Marchaim, Chopra, Bogan, et al., 2012). Τέλος στις ΗΠΑ, το CDC έχει προτείνει μέτρα πρόληψης μετάδοσης CPE στις εγκαταστάσεις περίθαλψης της χώρας, τα οποία περιλαμβάνουν προσπάθειες ανίχνευσης περισσότερων αποικισμένων ασυμπτωματικών ασθενών (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015). Τόσο το CDC, όσο και η European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) υποστηρίζουν τη διενέργεια πρόσθετων περιοδικών ελέγχων αποικισμού σε νοσηλευόμενους ασθενείς σε πτέρυγες υψηλού κινδύνου (MEΘ, ΜΜΟ κλπ.) (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009).



Στην Ελλάδα οι οδηγίες για τον έλεγχο για πιθανή φορεία ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών περιλαμβάνει τις εξής ομάδες: Α. Νοσηλεύόμενους ασθενείς: 1) με ιστορικό συν-νοσηλείας με ασθενή-φορέα πριν τη διάγνωση και την απομόνωσή του, 2) προερχόμενους από τμήματα υψηλού κινδύνου για λοίμωξη ή αποικισμό (π.χ. ΜΕΘ, αιματολογικές, ογκολογικές κλινικές, μονάδες τεχνητού νεφρού κ.α.) και 3) με παρατεταμένη νοσηλεία και λήψη αντιβιοτικών, ιδιαίτερος καρβαπενεμών. Β. Νεοεισαχθέντες ασθενείς: 1) με ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας (τελευταίο εξάμηνο) στη χώρα μας ή σε χώρα με επιδημία ή ενδημία για τα συγκεκριμένα στελέχη, 2) προερχόμενους από ιδρύματα χρονίως πασχόντων ή ασθενείς με συχνές επισκέψεις σε νοσοκομεία για αντιμετώπιση χρόνιων νοσημάτων (π.χ. νεφροπαθείς, αιματολογικοί, διαβητικοί ασθενείς κλπ.), 3) με γνωστό αποικισμό από CRE που εισάγονται εκ νέου στο νοσοκομείο. Τέλος σε περιπτώσεις συρροών κρουσμάτων ή σε τμήματα υψηλής επίπτωσης CRE, προτείνεται η χρήση της συστηματικής επιτήρησης των αποικισμών (active surveillance) ως βασικό μέτρο ελέγχου της διασποράς τους (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), 2015).

Πληθυσμοί ασθενών, οι οποίοι είναι υποψήφιοι για έλεγχο αποικισμού συνοψίζονται στο **διάγραμμα 1**.



**Διάγραμμα 1:** Έλεγχος αποικισμού με CRE σε νοσοκομειακό περιβάλλον (S. S. Richter & Marchaim, 2017).

## 6.5. Διάρκεια αποικισμού

Ο προσδιορισμός της διάρκειας αποικισμού των ασθενών είναι ένα δύσκολο εγχείρημα δεδομένου ότι τα Εντεροβακτηριακά αποτελούν μέρος της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας και ως εκ τούτου, ο αποικισμός με CRE μπορεί να επιμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Με βάση τον περιορισμένο αριθμό μελετών που υπάρχουν, ο αποικισμός μπορεί να διαρκέσει τουλάχιστον μερικούς μήνες (Ben-David et al., 2011). Η παρατεταμένη διάρκεια φορείας καταλήγει σε μεγαλύτερη δεξαμενή αποικισμένων ασθενών, υψηλότερη πίεση αποικισμού και ποσοστά μετάδοσης μεταξύ ασθενών. Σημαντικός περιορισμός στην αξιολόγηση του χρόνου κάθαρσης πολυανθεκτικών Εντροβακτηριακών από τον φορέα είναι και η περιορισμένη παρακολούθηση των ασθενών μετά το εξιτήριό τους με επαναληπτική λήψη φορειών. Οι Zimmerman et al. (Zimmerman et al., 2013) παρατήρησαν έναν μέσο χρόνο κάθαρσης του φορέα από CRE 387 ημερών μετά το εξιτήριο από το νοσοκομείο. Η διάρκεια του αποικισμού παρατεινόταν με επαναλαμβανόμενες εισαγωγές.

Δεδομένης της υψηλής θνητότητας που συνοδεύει τις λοιμώξεις από CRE, πολλές έρευνες, μεταξύ αυτών και RCTs (Nouvenne, Ticinesi, & Meschi, 2015), έχουν στοχεύσει στον καθορισμό της θέσης που μπορεί να έχει η θεραπεία αποαποικισμού (Machuca et al., 2016; Oren et al., 2013; Saidel-Odes et al., 2012). Συγκεκριμένα έχει ελεγχθεί η χρησιμότητα της θεραπείας με γενταμυκίνη και κολιστίνη σε πόσιμη μορφή και σε ρινικό gel, με υψηλά επίπεδα αποαποικισμού στις 2 και 6 εβδομάδες και βελτίωση στη θνητότητα και στην επίπτωση λοιμώξεων από CRE. Η αποτελεσματικότητα των θεραπειών αυτών αξιολογείται από την ESCMID το 2019 (Evelina Tacconelli et al., 2019) και λόγω στοιχείων αβεβαιότητας για μικροβιολογική εκρίζωση στην εβδομάδα 1 και στους 6 μήνες μετά τη θεραπεία αλλά και της επίπτωσης λοιμώξεων από CRE στους 6 μήνες αποθαρρύνεται η χρήση αντιβιοτικών παραγόντων για τον αποαποικισμό. Συστήνεται όμως ο σχεδιασμός κλινικών δοκιμών για την αξιολόγηση της χρήσης πόσιμης κολιστίνης με ή χωρίς γενταμυκίνη για την προσωρινή καταστολή του αποικισμού από CRE σε ασθενείς υψηλού κινδύνου.

## 7. Λοιμώξεις από CRE

### 7.1. Ορισμός CRE λοίμωξης

Ως κρούσμα ασθενούς με λοίμωξη από CRE ορίζεται ασθενής που νοσηλεύεται και εμφανίζει κλινική λοίμωξη από μικροβιολογικά τεκμηριωμένο ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *Enterobacteriales*, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολάβησει από την εισαγωγή του στο νοσοκομείο μέχρι την έναρξη των συμπτωμάτων 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.

### 7.2. Είδη λοιμώξεων

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά μικρόβια παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα κλινικής εικόνας, στο οποίο συμπεριλαμβάνονται βακτηριαμίες, πρωτοπαθείς ή σχετιζόμενες με ενδαγγειακούς καθετήρες (G. L. Daikos et al., 2009; G. L. Daikos et al., 2010; Maltezou et al., 2009), καθώς και πνευμονίες, συμπεριλαμβανομένων και των σχετιζόμενων με αναπνευστήρα (Bradford et al., 2004; Chung et al., 2011; Maltezou et al., 2009). Άλλες λοιμώξεις που έχουν σχετισθεί με πολυανθεκτικά μικρόβια είναι οι λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου και τραυμάτων (Gregory et al., 2010; Maltezou et al., 2009), η περιτονίτιδα (Maltezou et al., 2009), ενδοκαρδίτιδα (Benenson et al., 2009), μεσοθωρακίτιδα (Evangelopoulou, Myriantsefs, Markogiannakis, Baltopoulos, & Tsakris, 2008) και οι λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος (Maltezou et al., 2009).

Οι λοιμώξεις από CRE έχουν συσχετισθεί με υψηλή θνητότητα με αναφερόμενα ποσοστά ως 50%. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συνεισφέρουν σε αυτό το φαινόμενο. Μεταξύ αυτών είναι η μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας (Borer et al., 2012), η επιβαρυνμένη υγεία των ασθενών, η εστία της λοίμωξης, η συννοσηρότητα και κυρίως οι περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (Lübbert et al., 2014; M. Papadimitriou-Olivgeris et al., 2012). Η αντίχρεση πανανθεκτικών Εντεροβακτηριακών έχει ήδη αναφερθεί (Marchaim et al., 2011),

τονίζοντας έτσι τις θεραπευτικές προκλήσεις που προκύπτουν στη κλινική καθημερινότητα. Αποκτά έτσι ιδιαίτερη σημασία ο καθορισμός των παραγόντων κινδύνου ενός αποικισμένου ασθενούς να εξελίξει λοίμωξη από CRE, με στόχο την ανίχνευση τροποποιήσιμων παραγόντων και εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων για την αναστολή τους (Tischendorf, de Avila, & Safdar, 2016).

### 7.3. Παράγοντες κινδύνου

Πολλές έρευνες έχουν αναζητήσει τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης λοίμωξης από CRE και μία ποικιλία παραγόντων έχουν συσχετισθεί με τις λοιμώξεις αυτές. Βάσει πρόσφατης ανασκόπησης, σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση λοίμωξης από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά μικρόβια (CR-GN), είναι η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών, ιδιαιτέρως καρβαπενεμών, ο προηγούμενος αποικισμός από CR-GN, ο μηχανικός αερισμός, προηγούμενη νοσηλεία σε ΜΕΘ, η αιμοκάθαρση, η παρουσία καθετήρων, η μακρά διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο, και η συννοσηρότητα, καθώς και το υψηλό score APACHE II (Palacios-Baena et al., 2021).

Από τους βασικότερους παράγοντες που έχουν ταυτοποιηθεί για λοίμωξη από *K.pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση (CP-Kp) είναι η προχωρημένη ηλικία, η παρουσία σοβαρού υποκείμενου νοσήματος με υψηλό score APACHE-II και η μηχανική υποστήριξη της αναπνοής (G. L. Daikos et al., 2010; M. E. Falagas et al., 2007; Patel, Huprikar, Factor, Jenkins, & Calfee, 2008). Όσον αφορά στην προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών, αναδεικνύεται σε όλες τις μελέτες ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για λοίμωξη από CP-Kp (Evangelopoulou et al., 2008; Kwak et al., 2005; D. Wu, Cai, & Liu, 2011), ενώ υψηλότερου βαθμού συσχέτιση παρουσιάζει η πρότερη χρήση φθοριοκινολονών, αντιψευδομοναδικών πενικιλινών και καρβαπενεμών (G. L. Daikos et al., 2010; M. E. Falagas et al., 2007). Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση, πέραν των προαναφερθέντων, αναφέρονται ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου η μεταμόσχευση οργάνων, η χρήση στεροειδών και ανοσοκατασταλτικών, η παρουσία κεντρικών φλεβικών γραμμών, η παρουσία τραχειοστομίας, και η χορήγηση παρεντερικής διατροφής (J. Li, Li, Song, & Chen, 2020). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης από CP-Kp είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και οι χειρουργικές επεμβάσεις με παρουσία ξένων σωμάτων (M. E. Falagas et al., 2007). Επιπλέον, ο αποικισμός με CP-Kp κατά το προηγούμενο έτος φαίνεται να αποτελεί επίσης πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου

για εκδήλωση λοίμωξης από τον ίδιο μικροοργανισμό (Y. Li, Shen, Zhu, & Yu, 2019). Τέλος, το ιστορικό αποικισμού με CRE αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για αποικισμό με CRE κατά τη νέα εισαγωγή σε νοσοκομείο (Burillo et al., 2019).

#### **7.4. Κλίμακες αξιολόγησης κινδύνου αποικισμού, λοίμωξης και θνητότητας**

Κριτικής σημασίας στην επιτυχία της διακοπής της μετάδοσης των CRE σε μία μονάδα υγείας είναι η έγκαιρη ταυτοποίηση των αποικισμένων και/ή των ασθενών με λοίμωξη από CRE. Κατά συνέπεια κάθε κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίσει μία αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης. Το βασικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι ποιοί ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται για αποικισμό σε ένα περιβάλλον με περιορισμένους πόρους και υψηλή ενδημικότητα, όπως τα ελληνικά νοσοκομεία. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, η πιθανότητα de novo εισαγωγής CRE σε μία προηγουμένως ελεύθερη από CRE μονάδα είναι υψηλή (Miriagou et al., 2010). Με αυτά τα δεδομένα, η αξιολόγηση των ασθενών βάσει παραγόντων κινδύνου για αποικισμό, άμα τη αφίξει τους στο νοσοκομείο καθίσταται εκ των ων ουκ άνευ. Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της αθρόας διασποράς των CRE στις μονάδες υγείας παγκοσμίως, πολλές μελέτες έχουν ως στόχο τη δημιουργία κλιμάκων κινδύνου, με βάση τις οποίες μπορεί ευκολότερα να αξιολογηθεί η πιθανότητα αποικισμού ενός ασθενούς με ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά μικρόβια κατά την εισαγωγή του στο νοσοκομείο, η πιθανότητα λοίμωξης ενός αποικισμένου ασθενούς και η έκβαση της λοίμωξης (Burillo et al., 2019). Απώτερος στόχος της διαδικασίας αυτής είναι απομόνωση ενός πιθανά αποικισμένου ασθενούς έως ότου είναι διαθέσιμο το αποτέλεσμα της καλλιέργειας. Έως σήμερα δεν έχει θεσπιστεί η χρήση μίας καθολικά αποδεκτής κλίμακας αξιολόγησης του κινδύνου αποικισμού ενός ασθενούς με CRE κατά την εισαγωγή του στο νοσοκομείο, ανάγκη ιδιαίτερος σημαντική σε ένα ενδημικό περιβάλλον.

Οι Tseng et al. δημιούργησαν μία κλίμακα κινδύνου για αποικισμό με πολυανθεκτικά Gram αρνητικά μικρόβια (MDR-GN) κατά την εισαγωγή ενός ασθενούς στο νοσοκομείο, όπου προσδιορίστηκαν ως επιβαρυντικοί παράγοντες η μεγάλη ηλικία, η διαμονή σε εγκατάσταση μακροχρόνιας νοσηλείας, το ιστορικό εγκεφαλικών επεισοδίων, η προηγούμενη νοσηλεία εντός μηνός και η πρόσφατη έκθεση σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Tseng et al., 2017). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των Tumbarello et al, όπου κατασκευάζεται κλίμακα για τον αποικισμό ασθενών με ESBL κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο (M. Tumbarello et al., 2011). Τέλος, οι Lin et al. ανέπτυξαν ένα μοντέλο

πρόγνωσης φορείας CRE κατά την εισαγωγή ασθενών σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο, με αναδρομική καταγραφή του αποικισμού των ασθενών, χρησιμοποιώντας ως πηγή πληροφοριών τη βάση δεδομένων με στοιχεία των ασθενών που πήραν εξιτήριο από νοσοκομεία της πολιτείας του Ιλινόις. Ως παράγοντες κινδύνου προσδιορίστηκαν η ηλικία, το πλήθος των νοσηλειών σε μονάδες βραχείας νοσηλείας κατά το τελευταίο έτος, το πλήθος των νοσηλειών σε μονάδες μακροχρόνιας νοσηλείας, η μέση διάρκεια νοσηλείας, η τρέχουσα εισαγωγή σε μονάδα μακροχρόνιας νοσηλείας και η προηγούμενη εισαγωγή σε νοσοκομείο με κωδικό διάγνωσης λοίμωξης (Lin et al., 2019).

Πολλές έρευνες έχουν ως αντικείμενο την δημιουργία κλιμάκων κινδύνου, βάσει των οποίων προσδιορίζεται ποιοι από τους αποικισμένους ασθενείς έχουν υψηλότερη πιθανότητα εμφάνισης λοίμωξης από πολυανθεκτικά μικρόβια (A. Cano et al., 2018; Giannella, Pascale, Gutierrez-Gutierrez, Cano, & Viale, 2019; Giannella et al., 2014) . Παράλληλα, άλλες έρευνες επικεντρώνονται στη δημιουργία προγνωστικών κλιμάκων θνητότητας σε ασθενείς με βακτηριαμία ή αποικισμό από CRE, με στόχο την επιλογή της καλύτερης θεραπευτικής αγωγής (μονοθεραπείας vs. θεραπευτικού συνδυασμού) (A. Cano et al., 2018; Gutierrez-Gutierrez et al., 2017; M. J. Schwaber et al., 2008).

Η έρευνα των Johnson et al., αναπτύσσει κλίμακα για τον προσδιορισμό κινδύνου λοίμωξης από ESBL κατά την άφιξη στο νοσοκομείο (Johnson, Anderson, May, & Drew, 2013), ενώ το GSDCS score που αναπτύχθηκε από τους Vasudevan et al., προβλέπει την πιθανότητα νοσοκομειακής λοίμωξης από MDR-GN σε νοσηλευόμενους στη ΜΕΘ ασθενείς (Vasudevan, Mukhopadhyay, Li, Yuen, & Tambyah, 2014). Στην έρευνα των Teysseyre et al. δημιουργείται το CARBAScore, το οποίο προβλέπει την ανάγκη θεραπείας με καρβαπενέμες σε νοσηλευόμενους ασθενείς με μικροβιαμία ή πνευμονία, και ως παράγοντες κινδύνου ταυτοποιούνται η αιμοκάθαρση, το ταξίδι στο εξωτερικό κατά το τελευταίο 6μηνο, και ο προηγούμενος αποικισμός με MDR ή η προηγούμενη χρήση β-λακτάμης τάξης  $\geq 3$  (Teyseyre et al., 2019). Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα σκορ αναπτύχθηκε από τους Giannella et al. (Giannella score) και αξιολογεί τον κίνδυνο ένας αποικισμένος με ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K.pneumoniae* (CRKp) ασθενής να αναπτύξει μικροβιαμία, βάσει του ιστορικού νοσηλείας σε ΜΕΘ, του ιστορικού διενέργειας επεμβατικής διαδικασίας στην κοιλιακή χώρα, τη λήψη χημειο- ή ακτινοθεραπείας και το πλήθος των σημείων όπου ο ασθενής είναι αποικισμένος, πέραν του ορθού (Giannella et al., 2014). Οι Sullivan et al. προβλέπουν την πιθανότητα αντοχής στις καρβαπενέμες της *K.pneumoniae* σε ασθενείς με βακτηριαμία, ενώ αντίστοιχα (T. Sullivan, Ichikawa, Dudley, Li, & Aberg, 2018), οι Li et al. προβλέπουν την πιθανότητα αντοχής στις καρβαπενέμες της *K.pneumoniae* που

απομονώνεται από νοσηλεύομενους σε ΜΕΘ ασθενείς με λοίμωξη (Y. Li et al., 2019). Και στις δύο αυτές μελέτες, ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου προσδιορίζεται το ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης με *CRKp*, ενώ άλλοι παράγοντες που ταυτοποιούνται είναι η νοσηλεία σε νοσοκομειακή μονάδα υψηλού κινδύνου, η διαμονή σε οίκο ευγηρίας και η έκθεση σε καρβαπενέμες. Πολύ σημαντική κλίμακα για την αξιολόγηση της θνητότητας ασθενών με βακτηριαμία από CPE είναι η κλίμακα INCREMENT (ICS), όπου η διαστρωμάτωση των ασθενών με βάση την παρουσία βαριάς σήψης ή shock, το υψηλό Pitt score, το δείκτη Charlson  $\geq 2$ , την πηγή της μικροβιαμίας εκτός του ουροποιητικού και την ύπαρξη ιστορικού μη κατάλληλης αρχικής θεραπείας καθοδηγεί την κλινική απόφαση χορήγησης κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας (Gutierrez-Gutierrez et al., 2017). Συγκεκριμένα, η χορήγηση συνδυασμού αντιμικροβιακών σε ασθενείς με υψηλό ICS συσχετίστηκε με βελτίωση της επιβίωσης. Το ICS επικυρώθηκε σε πληθυσμό ασθενών με παθογόνα ανθεκτικά στην κολιστίνη (Machuca et al., 2019), σε ασθενείς υπό θεραπεία με κεφταζιδίμη/αβιμπακτάμη (Jorgensen et al., 2020), καθώς και σε ασθενείς νοσηλεύομενους σε ΜΕΘ με μικροβιαμία από *CPKp* (Matthaios Papadimitriou-Olivgeris et al., 2021). Τέλος, οι Cano et al. δημιούργησαν ένα συνδυασμό του Giannella score και του INCREMENT score (ICS) για να προβλέψουν τον κίνδυνο λοίμωξης και τη θνητότητα σε ασθενείς αποικισμένους με *CRKp* (Angela Cano et al., 2018).

## 7.5. Θεραπεία λοιμώξεων από CRE

Σχεδόν κανένα από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δεν ανήκει στη θεραπευτική φαρέτρα για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από CRE, ενώ οι περισσότερες καρβαπενεμάσες δεν αναστέλλονται από τους παραδοσιακούς αναστολείς β-λακταμασών (Xiaoan Cui et al., 2019). Κάποια αντιβιοτικά, όπως οι πολυμυξίνες, η τιγκεκυκλίνη και η φωσφομυκίνη μπορεί να έχουν δράση έναντι των CRE, ωστόσο, παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες ως μονοθεραπεία. Η πολυμυξίνη έχει σημαντική νεφρο- και νευροτοξικότητα (van Duin, Kaye, Neuner, & Bonomo, 2013) και η ιδανική δοσολογία είναι άγνωστη. Επιπλέον, η χρήση της πλέον περιορίζεται από την παγκόσμια διασπορά γόνων αντοχής στην κολιστίνη (*mcr*). Αντίστοιχες δυσκολίες παρουσιάζονται και με τη χρήση των υπόλοιπων «παλαιών» αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων και των αμινογλυκοσιδών. Γι' αυτούς τους λόγους, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι βελτίωσης της αποτελεσματικότητάς τους, όπως π.χ. οι υψηλότερες δόσεις κολιστίνης και τιγκεκυκλίνης (Matthew E Falagas, Vardakas, Tsiveriotis,

Triarides, & Tansarli, 2014). Σε αυτό το πλαίσιο προτείνονται συνδυαστικές θεραπείες για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από CRE. Όχι μόνο οι αναδρομικές μελέτες αλλά και οι δοκιμασίες *in vitro* και η κλινική εφαρμογή αποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός αντιβιοτικών είναι αποτελεσματικός και η θνητότητα σε ασθενείς που έλαβαν συνδυαστική θεραπεία, ιδιαιτέρως στους συνδυασμούς που συμπεριλαμβάνονταν καρβαπενέμη, ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τη μονοθεραπεία (Ku et al., 2017; Oliva et al., 2015). Διάφορα σχήματα συνδυαστικής θεραπείας έχουν προταθεί, χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί ο μηχανισμός της συνέργειας στα σχήματα αυτά (Baym, Stone, & Kishony, 2016).

**Πίνακας 6:** Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των συνδυαστικών σχημάτων θεραπείας των CRE (Xiaoyan Cui et al., 2019)

	Combination therapies	Advantages	Limitations	Mechanisms of resistance
Tigecycline-based combinations	<ol style="list-style-type: none"> <li>+aminoglycosides<sup>a</sup></li> <li>+carbapenems<sup>b</sup></li> <li>+fosfomycin</li> <li>+polymyxin</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Effective for kinds of CRE (Sader et al., 2015)</li> <li>Lower mortality rates</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Unclear mechanism</li> <li>Unclear optimal dose</li> <li>Poor pharmacokinetic properties (Giamarellou and Poulakou, 2011)</li> <li>Side effects were evident with increasing dose (Tasina et al., 2011; Ramirez et al., 2013)</li> <li>Inducing resistance</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Increasing expression of RND efflux pumps</li> <li>Mobile resistance genes, <i>tet(A)</i>, <i>tet(K)</i>, <i>tet(M)</i>, <i>tet(X3)</i>, and <i>tet(X4)</i> (Linkevicius et al., 2016; He et al., 2019)</li> </ol>
Polymyxin-based combinations	<ol style="list-style-type: none"> <li>+carbapenems<sup>b</sup></li> <li>+tigecycline</li> <li>+fosfomycin</li> </ol>			<ol style="list-style-type: none"> <li>Mobile colistin resistance genes</li> </ol>
Other combinations	<ol style="list-style-type: none"> <li>fosfomycin + aminoglycosides<sup>a</sup></li> <li>aztreonam + aminoglycosides<sup>a</sup></li> <li>Tigecycline + polymyxin + carbapenem<sup>b</sup></li> </ol>			<ol style="list-style-type: none"> <li>Fosfomycin-modified genes and modification of MurA for fosfomycin resistance (Solomkin et al., 2014)</li> <li><i>rmtB</i> for aminoglycosides resistance</li> </ol>

<sup>a</sup>Aminoglycosides refer to amikacin and isepamicin. <sup>b</sup>Carbapenems refer to meropenem and imipenem.

Πέραν των συνδυαστικών θεραπευτικών σχημάτων, έχουν αναπτυχθεί και νέοι αναστολείς β-λακταμασών και άλλα είδη αντιβιοτικών για τη θεραπεία των λοιμώξεων από CRE. Η αβιμπακτάμη είναι ένας νέος αναστολέας β-λακταμάσης που αναστέλλει τις KPC, ESBL, AmpC (van Duin & Bonomo, 2016) και OXA-48 και η χρήση της μαζί με την κεφταζιδίμη (CAZ-AVI) έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικά πρωτόκολλα στις ΗΠΑ από το 2015 και προτάθηκε από το CLSI το 2018. Ο συνδυασμός αυτός είναι επίσης αποτελεσματικός έναντι στην hypervirulent *K.pneumoniae* που φέρει *bla*<sub>KPC-2</sub> (Yu et al., 2018). Επιπλέον, κλινικές αναφορές υποδεικνύουν ότι η CAZ-AVI παρουσιάζει αξιόλογο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε επιπλεγμένες λοιμώξεις ουροποιητικού ή ενδοκοιλιακές λοιμώξεις. Σε σύγκριση με την κολιστίνη, επιδεικνύει χαμηλότερη θνητότητα, λιγότερες παρενέργειες και



καλύτερη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία των Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC (Van Duin et al., 2018). Δυστυχώς, ήδη από το 2015 έχει αναφερθεί ο εντοπισμός στελεχών ανθεκτικών στην CAZ-AVI (Shields et al., 2017). Για να διευρυνθεί το αντιμικροβιακό φάσμα, προτάθηκε ο συνδυασμός αζτρεονάμης-αβιμπακτάμης, ο οποίος αναστέλλει αποτελεσματικά καρβαπενεμάσες τάξης A, B, C και D (Shawn Vasoo, Cunningham, et al., 2015). Δύο άλλοι συνδυασμοί καρβαπενέμης-αναστολέων β-λακταμασών που αναπτύχθηκαν είναι οι ιμιπενέμη-ρελεμπακτάμη (IMI/REL) και η μεροπενέμη-βαμπορμπακτάμη (MEV). Οι συνδυασμοί αυτοί φαίνεται ότι είναι σημαντικά αποτελεσματικοί έναντι Εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC, αλλά όχι τόσο έναντι των MBL και OXA καρβαπενεμασών (Lapuebla et al., 2015). Πέραν αυτών, και άλλα συνδυαστικά σχήματα, αλλά και άλλα νέα αντιβιοτικά όπως η πλαζομυκίνη, η σεφιδεροκόλη κ.α. βρίσκονται σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης. Μεταξύ αυτών, η πλαζομυκίνη επέδειξε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με άλλες αμινογλυκοσίδες (Castanheira et al., 2018). Τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί των νέων αντιμικροβιακών παραγόντων (με έγκριση μετά το 2010) φαίνονται παρακάτω.

**Πίνακας 7:** Πλεονεκτήματα και περιορισμοί των νέων αντιμικροβιακών για τη θεραπεία των CRE (Xiaoyan Cui et al., 2019)

Antimicrobial therapeutics	Advantages	Limitations	Mechanisms of resistance
Ceftazidime-avibactam	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of KPC, OXA-48, ESBLs</li> <li>2. Effective for CR-hvKp</li> <li>3. Effective for complicated urinary tract and intra-abdominal infections</li> <li>4. Low mortality risk (Shields et al., 2016)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poor inhibition of MBLs and the other OXA (Livermore et al., 2016)</li> <li>2. Unclear efficacy on other infections</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mutation of Ompk35/Ompk36 and high expression of KPC and SHV (Nelson et al., 2017)</li> <li>2. Point mutation (Shields et al., 2017)</li> </ol>
Aztreonam-avibactam	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of KPC, MBLs, ESBLs, OXA</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Insufficient phase III clinical trials data</li> </ol>	
Imipenem-relebactam	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of KPC</li> <li>2. Favorable <i>in vitro</i> activity (Lob et al., 2017)</li> <li>3. Well tolerated (Sims et al., 2017)</li> <li>4. Few adverse events (Zhan et al., 2018)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poor inhibition of MBLs and OXA (Lapuebla et al., 2015a)</li> <li>2. Insufficient phase III clinical trials data (Sims et al., 2017)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Low expression of OmpK36 (Hecker et al., 2015)</li> </ol>
Meropenem-vaborbactam	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of KPC (Lapuebla et al., 2015b)</li> <li>2. Well tolerated</li> <li>3. Few adverse events (Zhan et al., 2018)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poor inhibition of MBLs and OXA (Lapuebla et al., 2015b)</li> <li>2. Insufficient clinical data support</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Low expression of OmpK35 and OmpK36 (Ritchie and Garavaglia-Wilson, 2014)</li> </ol>
Plazomicin	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of KPC and OXA (Castanheira et al., 2018)</li> <li>2. More potent activity and lower side effects than other aminoglycosides</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poor inhibition of MBLs</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Methylation of 16S rRNA (Livermore et al., 2011)</li> <li>2. Aminoglycoside modifying enzyme (Castanheira et al., 2018)</li> </ol>
Eravacycline	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Well pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability, and <i>in vitro</i> activity (Lan et al., 2019; McCarthy, 2019)</li> <li>2. Performance in complicated intra-abdominal infections (Heaney et al., 2019)</li> <li>3. Non-renal pathway clearance (Lee and Burton, 2019)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Suboptimal in complicated urinary tract infections (Lee and Burton, 2019)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Upregulation of efflux pumps (Livermore et al., 2011)</li> <li>2. Mobile resistance genes, <i>tet(X3)</i> and <i>tet(X4)</i> (He et al., 2019)</li> </ol>
Cefiderocol	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibition of kinds of carbapenemases</li> <li>2. Well tolerability</li> <li>3. High microbiological response rates and eradication rates (Zhan et al., 2019)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Unclear optimal dose</li> <li>2. Insufficient phase III clinical trials data</li> </ol>	

Ενδιαφέρον παρουσιάζει συστηματική ανασκόπηση από τους Τζουβελέκη και συν. (L. Tzouveleakis, Markogiannakis, Piperaki, Souli, & Daikos, 2014), που συμπεριέλαβε είκοσι μελέτες στις οποίες αναφέρθηκαν λοιμώξεις από CRE και περιείχαν επαρκείς πληροφορίες για την *in vitro* ευαισθησία των μικροοργανισμών στα χρησιμοποιούμενα αντιμικροβιακά, τον τύπο καρβαπενεμάσης που παρήγαγαν, τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιήθηκαν και την έκβαση της λοίμωξης. Η πλειοψηφία των μελετών αφορούσε λοιμώξεις από στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παρήγαγαν KPC ή VIM καρβαπενεμάσες, καθώς η κλινική εμπειρία με άλλα στελέχη (OXA-48 και NDM) είναι αρκετά περιορισμένη. Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών είχε σοβαρές λοιμώξεις: πρωτοπαθή βακτηριαιμία, βακτηριαιμία από ενδοφλέβιο καθετήρα, πνευμονία, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις και ουρολοιμώξεις. Στόχος της μελέτης ήταν η σύγκριση μεταξύ μονοθεραπείας και διπλού θεραπευτικού σχήματος. Η χρήση μόνο ενός *in vitro* δραστικού θεραπευτικού παράγοντα (καρβαπενέμη, τιγκεκυκλίνη ή κολιστίνη) είχε σαν αποτέλεσμα πολύ ψηλά ποσοστά θνησιμότητας (40-43%), συγκρίσιμα με αυτά των ασθενών που έλαβαν ακατάλληλη αντιβιοτική αγωγή (δεν υπήρχε κανένα δραστικό φάρμακο *in vitro*) (46%). Η χαμηλή αποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας ήταν πιο εμφανής σε ασθενείς με σήψη, σηπτικό shock και σε ασθενείς με θανατηφόρο υποκείμενο νόσημα.

Αντιθέτως, η συνδυαστική θεραπεία παρουσίασε σαφές θεραπευτικό πλεονέκτημα ως προς την επιβίωση. Ιδιαίτερως η χρήση καρβαπενέμης στο διπλό θεραπευτικό σχήμα παρουσίασε χαμηλότερη θνητότητα (19%) σε σχέση με τα σχήματα χωρίς καρβαπενέμη (31%). Μεγαλύτερη θνητότητα εμφάνισαν ασθενείς με πρωτοπαθή βακτηριαιμία και χαμηλότερα, ασθενείς με ουρολοίμωξη, ενώ η μονοθεραπεία σχετίστηκε με υψηλή θνητότητα για όλους τους τύπους των λοιμώξεων. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η υπεροχή της συνδυασμένης θεραπείας οφείλεται μερικώς στην αθροιστική ή συνεργική δράση των καρβαπενεμών με την κολιστίνη, την τυγκεκυκλίνη και τις αμινογλυκοσίδες.

Η κολιστίνη, παρά την αυξανόμενη τάση για αντοχή μεταξύ των CRE, συνεχίζει να αποτελεί ένα από τους πλέον ενεργούς *in vitro* παράγοντες ενάντια στους μικροοργανισμούς αυτούς. 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 (G. Daikos et al., 2010; Skiada, Markogiannakis, Plachouras, & Daikos, 2011). Επιπλέον, ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η νευροτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα δεν είναι αμελητέες. Η τυγκεκυκλίνη ως μονοθεραπεία παρουσιάζει επίσης φτωχά αποτελέσματα, καθώς έχει κυρίως βακτηριοστατική δράση και δεν εμφανίζει θεραπευτικές συγκεντρώσεις σε αρκετές

ανατομικές θέσεις (Agwuh & MacGowan, 2006). Δεδομένου ότι η φωσφομυκίνη παρουσιάζει καλή δραστικότητα *in vitro* ενάντια στα περισσότερα CRE, ο παράγοντας αυτός θα μπορούσε να επιλεγεί ως θεραπεία σωτηρίας σε καταστάσεις με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Έχει θέση κυρίως σε λοιμώξεις του κατώτερου ουροποιητικού, αλλά και συνδυαστικά σε βαριές CRE λοιμώξεις (Michalopoulos et al., 2010). Τέλος, ένας σημαντικός αριθμός CRE, ιδίως όσα παράγουν ένζυμα KPC και VIM, παρουσιάζουν *in vitro* ευαισθησία στις αμινογλυκοσίδες (George L Daikos et al., 2014; Mario Tumbarello et al., 2012). Δεδομένου ότι υπάρχει μεγάλη κλινική εμπειρία στη χρήση αυτής της ομάδας αντιβιοτικών, θεωρούνται η βέλτιστη επιλογή στα συνδυαστικά σχήματα (G. L. Daikos et al., 2012). Επιπλέον, όπως φάνηκε στην αναφερθείσα ανασκόπηση, είναι η πιο αποτελεσματική μονοθεραπεία, ιδιαιτέρως σε λοιμώξεις του ουροποιητικού. (L. Tzouveleakis et al., 2014; Σπυριδοπούλου, 2020).

Ιδανικά, η αξιολόγηση των θεραπευτικών σχημάτων που χρησιμοποιούνται στις λοιμώξεις από CRE πρέπει να γίνεται με τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές (randomized control trials, RCTs). Παρά το μακροχρόνιο επιδεινούμενο «πρόβλημα των καρβαπενεμασών» μόνο δύο τέτοιες μελέτες έχουν ολοκληρωθεί ως τώρα στην Ευρώπη (AIDA, NCT01732250; <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01732250>) και τις ΗΠΑ (NCT01597973; <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01597973>), στις οποίες έγινε αξιολόγηση της θεραπείας με κολιστίνη έναντι του συνδυασμού κολιστίνης-καρβαπενέμης, χωρίς ωστόσο να αποδειχθεί η υπεροχή του συνδυαστικού θεραπευτικού σχήματος (Kaye et al., 2021; Mical Paul et al., 2018). Οι κατευθυντήριες οδηγίες εφιστούν την προσοχή στη χρήση της κολιστίνης ως μονοθεραπεία, τόσο λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας, όσο και λόγω ανάπτυξης αντοχής. Δεδομένης της έλλειψης τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών και των τεχνικών δυσκολιών που παρουσιάζουν, η θεραπευτική προσέγγιση των λοιμώξεων από CRE βασίζεται κυρίως στην κλινική εμπειρία. Ο μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων ερευνών παρατήρησης και αναφορών περιστατικών δεν μπορεί να αντικαταστήσει τις τυχαιοποιημένες μελέτες, καθώς οι πρώτες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τον τύπο της λοίμωξης, τις ομάδες των ασθενών αλλά και τα θεραπευτικά σχήματα σε χρήση. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η κριτική αξιολόγηση των δημοσιευμένων κλινικών δεδομένων δεν είναι μόνο δικαιολογημένη αλλά και απαραίτητη προκειμένου να βελτιωθεί η φροντίδα των ασθενών με λοίμωξη από CRE (Σπυριδοπούλου, 2020).

Σε απάντηση σε όλα αυτά τα ερωτήματα που προκύπτουν στην κλινική πράξη ως προς τη θεραπεία των CRE η IDSA (Pranita D Tamma et al., 2020) και η ESCMID (Mical Paul et al., 2022) εξέδωσαν κατευθυντήριες οδηγίες το 2020 και 2022 αντίστοιχα. Βάσει των

οδηγιών της ESCMID, σε ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις (δηλ. σήψη ή σηπτικό σοκ) από CRE, προτείνεται η χρήση μεροπενέμης-βαμπορμπακτάμης (MEV) ή κεφαζιδίμης-αβιμπακτάμης (CAZ-AVI), σε *in vitro* ευαισθησία, ενώ για στελέχη που παράγουν MBL ή είναι ανθεκτικά στους υπόλοιπους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των MEV και CAZ-AVI, συνιστάται η σεφιδεροκόλη. Αντίθετα, στα πλαίσια της αντιμικροβιακής επιμελητείας, σε ασθενείς με μη-σοβαρές λοιμώξεις προτείνεται η εξατομικευμένη χρήση παλαιών αντιβιοτικών (αντιβιοτικά με έγκριση πριν το 2010) με ευαισθησία *in vitro* και ανάλογα με την πηγή της λοίμωξης. Σε ασθενείς με επιπλεγμένη λοίμωξη ουροποιητικού προτείνεται η χρήση αμινογλυκοσίδης, με προτίμηση στην πλαζομυκίνη έναντι της τιγκεκυκλίνης. Επιπλέον, αντενδείκνυται η χρήση τιγκεκυκλίνης για μικροβιαμία και νοσοκομειακή ή σχετιζόμενη με αναπνευστήρα πνευμονία (HAP/VAP), παρά μόνο σε υψηλές δόσεις αν είναι αναγκαίο.

Όσον αφορά το συνδυασμό παραγόντων, δεν προτείνεται η χρήση συνδυαστικών σχημάτων εφόσον ο μικροβιακός παράγων είναι ευαίσθητος στην CAZ-AVI, MEV, ή σεφιδεροκόλη. Σε περιπτώσεις ασθενών με σοβαρές λοιμώξεις από CRE που παράγουν MBL και/ή είναι ανθεκτικά στις νεότερες μονοθεραπείες συστήνεται ο συνδυασμός CAZ-AVI και αζτρεονάμης, ενώ σε ευαισθησία του μικροβιακού παράγοντα *in vitro* μόνο στις πολυμυξίνες, τιγκεκυκλίνη, αμινογλυκοσίδες ή φωσφομυκίνη, ή σε περιπτώσεις μη διαθεσιμότητας των νέων συνδυασμών β-λακτάμης με αναστολέα, προτείνεται η θεραπεία με συνδυασμό αντιβιοτικών δραστικών *in vitro*. Τέλος, συστήνεται η αποφυγή χρήσης καρβαπενέμης στα συνδυαστικά σχήματα όπου δεν χρησιμοποιείται β-λακτάμη με αναστολέα (Mical Paul et al., 2022).

Η IDSA διαχωρίζει τις λοιμώξεις σε απλή κυστίτιδα, επιπλεγμένη λοίμωξη ουροποιητικού και εκτός ουροποιητικού. Για την κυστίτιδα, συνιστώνται οι κινολόνες (στις οποίες ωστόσο παρουσιάζονται υψηλά ποσοστά αντοχής στην Ελλάδα), η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMX), η νιτροφουραντοΐνη ή εφάπαξ δόση αμινογλυκοσίδης, ενώ για τις επιπλεγμένες λοιμώξεις ουροποιητικού προτιμώνται οι CAZ-AVI, MEV, ιμιπενέμη-σιλαστατίνη-ρελεμπακτάμη (IMI/cilastatin/REL) και σεφιδεροκόλη. Για τις υπόλοιπες λοιμώξεις από CRE συστήνονται οι CAZ-AVI, MEV και IMI/cilastatin/REL για τα παράγοντα KPC μικρόβια, ο συνδυασμός CAZ-AVI με αζτρεονάμη ή η σεφιδεροκόλη ως μονοθεραπεία για τα παράγοντα MBL, και η CAZ-AVI για όσα παράγουν OXA-48 (Pranita D Tamma et al., 2020).

## *Ειδικό μέρος*

## 1. Στόχοι μελέτης

Η αυξανόμενη επίπτωση και η παγκόσμια διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Εντεροβακτηριακών (CRE) αποτελούν ανησυχητικά φαινόμενα της τελευταίας δεκαετίας, καθώς απειλούν σε σημαντικό βαθμό τη δημόσια υγεία. Η χρήση των καρβαπενεμών μέχρι πρότινος εξασφάλιζε μία ισχυρή θεραπευτική επιλογή έναντι των απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη αντοχής των εντεροβακτηριακών στελεχών και στις καρβαπενέμες και η δοασπορά τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον αποτελεί μία νέα θεραπευτική πρόκληση (M. J. Schwaber & Carmeli, 2008).

Η πρόσφατη εξάπλωση στελεχών CRE και ειδικότερα στελεχών *K.pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (carbapenemase-producing *K.pneumoniae*, CPKp) αποτελεί κυρίαρχη απειλή για τους νοσηλευόμενους ασθενείς (Poulou et al., 2012). Τα στελέχη αυτά προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις σε εξασθενημένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, οι οποίες σχετίζονται με παρατεταμένη νοσηλεία και υψηλά ποσοστά θνητότητας (L. S. Tzouveleki et al., 2012). Παρ' όλη τη χρήση νέων αντιμικροβιακών, όπως η τιγκεκυκλίνη, αλλά και την επανεισαγωγή της κολιστίνης στη θεραπεία, το πρόβλημα δεν έχει λυθεί. Η ασυμπτωματική φορεία CPE στο γαστρεντερικό σύστημα θεωρείται ως η κυρίαρχη πηγή συνεχούς μετάδοσης, αναδεικνύοντας το ρόλο της απομόνωσης του φορέα στον έλεγχο της εξάπλωσης (P. Nordmann & Poirel, 2013). Δεδομένων λοιπόν των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών, αναδύεται η σημασία της έγκαιρης ανίχνευσης και λήψης μέτρων περιορισμού της ενδονοσοκομειακής εξάπλωσης τέτοιου είδους μικροβίων. Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα ήταν χρήσιμη η εφαρμογή μίας απλής και αποτελεσματικής δοκιμασίας ανίχνευσης των εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες (carbapenemase-producing *Enterobacteriales*, CPE).

Πλην της έγκαιρης ανίχνευσης μέσω της κατάλληλης δοκιμασίας, κρίνεται απαραίτητη και η στοχευμένη ανίχνευση, δεδομένου του μεγάλου όγκου ασθενών που προσέρχεται στα δημόσια νοσοκομεία, αλλά και των περιορισμένων διαθέσιμων πόρων. Αναδεικνύεται έτσι η ανάγκη δημιουργίας ενός δείκτη πρόβλεψης βασισμένου στους παράγοντες κινδύνου του ασθενούς, με στόχο να επιλέγονται οι ασθενείς στους οποίους χρειάζεται να γίνεται έλεγχος για φορεία CPE. Έτσι διαμορφώθηκαν ως πρωτεύοντες στόχοι της διατριβής ο προσδιορισμός των παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη *Enterobacteriales* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) ασθενών που εισάγονται σε

τριτοβάθμιο νοσοκομείο και η δημιουργία μίας κλίμακας κινδύνου (risk score) για αποικισμό με CPE βάσει των παραγόντων κινδύνου.

Έως σήμερα, για την ανίχνευση των στελεχών CPE χρησιμοποιούνται διάφορες φαινοτυπικές μέθοδοι βασισμένες στους χηλικούς παράγοντες (EDTA) για τις μεταλλο-β-λακταμάσες (MβLs) (Miriagou et al., 2010) και στην ευαισθησία των καρβαπενεμασών τύπου KPC στο βορονικό οξύ (Fernando Pasteran, Tania Mendez, Leonor Guerriero, Melina Rapoport, & Alejandra Corso, 2009; Athanassios Tsakris et al., 2009). Πέραν των φαινοτυπικών μεθόδων μπορεί να γίνει μοριακή ανίχνευση των γονιδίων καρβαπενεμασών μέσω PCR. Κατ' αυτόν τον τρόπο, αφενός μειώνεται ο χρόνος ταυτοποίησης αποικισμένων ασθενών, αφετέρου μπορεί να γίνει ανίχνευση των γονιδίων της OXA-48 καρβαπενεμάσης, για την οποία δεν εφαρμόζονται ειδικές φαινοτυπικές μέθοδοι (Laurent Poirel, Walsh, Cuvillier, & Nordmann, 2011). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα εφαρμογής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) απευθείας στο δείγμα του ασθενούς, χωρίς προηγουμένως να έχει καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υλικό, μέθοδος η οποία θα μείωνε περαιτέρω το χρόνο ανίχνευσης αλλά ακόμα δεν έχει αξιολογηθεί συστηματικά (Avlami et al., 2010). Δεδομένης λοιπόν της έλλειψης μίας και μοναδικής μεθόδου εκλογής (gold standard) για την αναζήτηση CPE σε αποικισμένους ασθενείς και δεδομένου του περιορισμένου αριθμού ερευνών στις οποίες γίνεται σύγκριση μεταξύ των μεθόδων (φαινοτυπικών και μοριακών), η παρούσα μελέτη θέτει ως δευτερεύοντα στόχο τη συγκριτική αξιολόγηση των δύο μεθόδων, με τελικό σκοπό την επιτάχυνση της διάγνωσης και την έγκαιρη απομόνωση του ασθενή-φορέα. Επιπλέον τίθεται ως δευτερεύων στόχος ο προσδιορισμός του ποσοστού των αποικισμένων με CPE ασθενών που εξελίσσονται σε CPE βακτηριαμία.

a. Πρωτεύοντες στόχοι

- i. Ο προσδιορισμός των παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη *Enterobacterales* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) ασθενών που εισάγονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο.
- ii. Η δημιουργία μίας κλίμακας κινδύνου (risk score) για αποικισμό με CPE βασισμένης στους παράγοντες κινδύνου.

b. Δευτερεύοντες στόχοι

- i. Η συγκριτική αξιολόγηση φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ανίχνευσης φορέας με CPE.
- ii. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των αποικισμένων με CPE ασθενών που εξελίσσονται σε CPE βακτηριαμία.

## 2. Μεθοδολογία

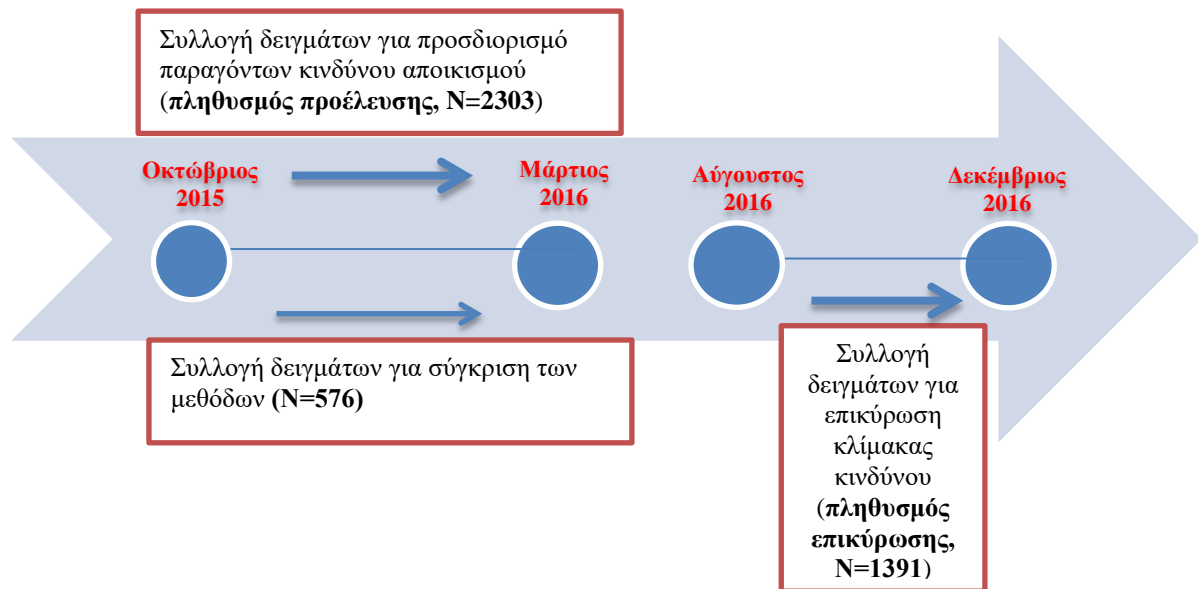
### 2.1. Σχεδιασμός και διεξαγωγή της μελέτης

Η μελέτη διεξήχθη στο Γ.Ν.Α «Λαϊκό» και ο υπό μελέτη πληθυσμός συμπεριέλαβε ασθενείς που εισήχθησαν στο χειρουργικό και παθολογικό τομέα και συγκεκριμένα στην Α΄ Παθολογική (ΑΠΚ), Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική (ΑΠΠΚ), Νεφρολογική (ΝΚ), Αιματολογική (ΑΚ), Χειρουργική (ΧΚ) και Ουρολογική Κλινική (ΟυΚ) του Λαϊκού Νοσοκομείου. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, μεταξύ Οκτωβρίου 2015 και Μαρτίου 2016, συμπεριλήφθησαν 2,303 ασθενείς, οι οποίοι εισήχθησαν στο νοσοκομείο και στους οποίους έγινε έλεγχος για αποικισμό με CPE μέσω λήψης ορθικού δείγματος. Το χρονικό περιθώριο για τη λήψη του δείγματος ήταν οι 48 ώρες από την εισαγωγή τους. Επιπλέον ελήφθησαν πληροφορίες του ιστορικού των ασθενών με στόχο τον προσδιορισμό των παραγόντων κινδύνου αποικισμού με CPE και τη δημιουργία του συστήματος πρόβλεψης (πρωτεύοντες στόχοι). Ο πληθυσμός αυτός αποτέλεσε τον πληθυσμό προέλευσης (**derivation population**) της μελέτης. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς υπολογίζεται ότι αποτέλεσαν το 94% του συνόλου των εισαγωγών (N=2,450 ασθενείς) της αντίστοιχης περιόδου. Επιπλέον, στον πληθυσμό αυτό πραγματοποιήθηκε η σύγκριση φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ανίχνευσης φορέας με CPE (δευτερεύων στόχος). Σε αναλογία ασθενών 1:4 με τυχαία κατανομή έγινε λήψη ορθικού δείγματος με δύο βαμβακοφόρους στυλεούς, ο ένας εκ των οποίων χρησιμοποιήθηκε για τις φαινοτυπικές μεθόδους, ενώ ο δεύτερος για την μοριακή ανάλυση.

Το δεύτερο μέρος της μελέτης έλαβε χώρα μεταξύ Αυγούστου και Δεκεμβρίου 2016. 1,391 ασθενείς που εισήχθησαν στις συμμετέχουσες κλινικές κατά τη χρονική αυτή περίοδο αποτέλεσαν τον πληθυσμό επικύρωσης του συστήματος πρόβλεψης (**validation population**). Οι συγκεκριμένοι ασθενείς υπολογίζεται ότι αποτέλεσαν το 81% του συνόλου των



εισαγωγών της συγκεκριμένης χρονικής περιόδου (N=1,717 ασθενείς). Η κλίμακα πρόγνωσης δημιουργήθηκε με βάση τις πληροφορίες των ασθενών που συμμετείχαν στο πρώτο στάδιο της μελέτης (derivation), και επικυρώθηκε στον δεύτερο πληθυσμό (validation). Στο **διάγραμμα 2** απεικονίζεται η χρονική εξέλιξη των σταδίων της μελέτης.



**Διάγραμμα 2:** Χρονική εξέλιξη των σταδίων της μελέτης

### 2.1.1. Ορισμοί

Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά (CRE) ορίστηκαν με βάση το CDC (2018) ως στελέχη που παρουσιάζουν αντοχή σε τουλάχιστον μία από τις καρβαπενέμες (ερταπενέμη, μεροπενέμη, δοριπενέμη, ή ιμιπενέμη) ή παράγουν καρβαπενεμάση (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018). Για την κατηγοριοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις καρβαπενέμες χρησιμοποιήθηκαν οι οδηγίες του CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017). Ο αποικισμός από CRE ορίστηκε ως η απομόνωση ενός Εντεροβακτηριακού ανθεκτικού στις καρβαπενέμες στην καλλιέργεια ενός ορθικού δείγματος από ασθενή χωρίς κλινικά συμπτώματα λοίμωξης (E. Tacconelli et al., 2014).

### **2.1.2. Ζητήματα ηθικής και προστασίας δεδομένων**

Η μελέτη έλαβε έγκριση διεξαγωγής από την Επιστημονική Επιτροπή του Νοσοκομείου (Αριθμός Πρωτοκόλλου: 137, 10-02-2015). Η έγκριση συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων των ασθενών δόθηκε από την Αρχή Προστασίας Δεδομένων Προσωπικού Χαρακτήρα (Αριθμός Άδειας 1588, Αρ. Πρωτοκόλλου: ΓΝ/ΕΞ/1984-2/23-10-2015). Τα κριτήρια επιλογής και αποκλεισμού ήταν όμοια για τους δύο πληθυσμούς. Όσοι ασθενείς συμμετείχαν στον πληθυσμό προέλευσης αποκλείστηκαν από τον πληθυσμό ελέγχου.

### **2.1.3. Κριτήρια επιλογής**

- Ηλικία άνω των 18 ετών
- Εισαγωγή σε κλινικές του Παθολογικού και Χειρουργικού τομέα του Λαϊκού Νοσοκομείου

### **2.1.4. Κριτήρια αποκλεισμού**

- Ηλικία μικρότερη των 18 ετών
- Ύπαρξη παθήσεων που εμποδίζουν τη λήψη δείγματος
- Άρνηση συμμετοχής του ασθενούς

Ειδικά για τους ασθενείς που αποτέλεσαν τους πληθυσμούς προέλευσης (derivation) και επικύρωσης (validation):

- Προηγούμενος αποικισμός με CRE κατά τη διάρκεια νοσηλείας στο ίδιο νοσοκομείο
- Ατελής καταγραφή ιστορικού

### **2.1.5. Συλλογή δεδομένων**

Όλα τα δείγματα φορέας που ελήφθησαν, τα αποτελέσματα αυτών και τα χαρακτηριστικά των CPE στελεχών που απομονώθηκαν καταγράφηκαν σε ηλεκτρονική βάση δεδομένων. Τα κλινικά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών συλλέχθηκαν με τη χρήση τυποποιημένου ερωτηματολογίου, μέσω του ηλεκτρονικού συστήματος καταγραφής αποτελεσμάτων εργαστηριακών και παρακλινικών εξετάσεων του νοσοκομείου. Επιπλέον

έγινε συλλογή πληροφοριών συμπεριλαμβανομένων στους φακέλους των ασθενών και τέλος, έγινε λήψη ιστορικού εκ νέου δια ζώσης, με ιδιαίτερη έμφαση στα στοιχεία του ερωτηματολογίου.

Στα δημογραφικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν συμπεριλήφθηκε η ηλικία, το φύλο, το τμήμα εισαγωγής, η διαμονή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας ή γηροκομείο, καθώς και ιστορικό μεταφοράς από άλλο νοσοκομείο ή ΜΕΘ. Τα κλινικά χαρακτηριστικά που αναζητήθηκαν αφορούσαν το ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας για περισσότερο από δύο 24ωρα (>48 ώρες) ή εισαγωγής σε ΜΕΘ κατά το τελευταίο 6μηνο καθώς και τη διάρκεια αυτής (M. Tumbarello et al., 2011).

Η επίπτωση υποκείμενων παθήσεων και συννοσηρότητας αξιολογήθηκε για το τελευταίο 6μηνο με τη χρήση του Charlson comorbidity index (CCI) (Charlson, Pompei, Ales, & MacKenzie, 1987) και ελέγχθηκαν οι εξής παράγοντες: ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, καρδιαγγειακής νόσου, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, ηπατοπάθειας, πεπτικού έλκους, χρόνιας νεφρικής νόσου, διαβήτη με ή χωρίς βλάβη οργάνου-στόχου, συμπαγούς όγκου με ή χωρίς μεταστάσεις, αιματολογικής κακοήθειας ή λοίμωξης HIV (M. J. Schwaber et al., 2008). Επιπλέον καταγράφηκε η ύπαρξη ιστορικού χειρουργικής επέμβασης ή οποιασδήποτε άλλης επεμβατικής διαδικασίας κατά το τελευταίο 6μηνο. Στον όρο επεμβατική διαδικασία συμπεριλήφθησαν τα εξής: ενδοσκόπηση του πεπτικού συστήματος, ενδοσκοπική ανάστροφη χολαγγειοπακρεατογραφία (ERCP), τοποθέτηση γαστροστομίας, τοποθέτηση stent χοληφόρων, βρογχοσκόπηση, διασωλήνωση, αιμοκάθαρση, τοποθέτηση νεφροστομίας, κυστεοσκόπηση και τοποθέτηση ουρητηρικού stent. Αναζητήθηκε επίσης η ύπαρξη ιστορικού τοποθέτησης κεντρικής φλεβικής γραμμής, ρινογαστρικού καθετήρα, χειρουργικής παροχέτευσης και ουροκαθετήρα (Eser et al., 2019). Τέλος, αξιολογήθηκε η παρουσία καθετήρων (κεντρικού φλεβικού, ουροκαθετήρα, ρινογαστρικού καθετήρα ή χειρουργικής παροχέτευσης) κατά την προσέλευση του ασθενούς στο νοσοκομείο ως πιθανός παράγοντας κινδύνου αποικισμού.

Η λήψη οποιουδήποτε αντιβιοτικού παράγοντα εντός ή εκτός νοσηλείας, ανοσοκατασταλτικής ή χημειοθεραπευτικής αγωγής κατά το τελευταίο 6μηνο αξιολογήθηκε επίσης ως πιθανός παράγοντας κινδύνου. Το επίπεδο λειτουργικότητας των ασθενών αξιολογήθηκε με χρήση του δείκτη Karnofsky (Crooks, Waller, Smith, & Hahn, 1991). Οι αποικισμένοι με CPE ασθενείς παρακολούθηθηκαν περαιτέρω και καταγράφηκε το ποσοστό όσων παρουσίασαν βακτηριαιμία από το μικρόβιο αποικισμού.

### 2.1.6. Εργαστηριακές μέθοδοι

Πραγματοποιήθηκε λήψη ορθικού δείγματος με τη χρήση αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών στους ασθενείς οι οποίοι εισήχθησαν στις συμμετέχουσες κλινικές του Λαϊκού Νοσοκομείου όσο το δυνατό νωρίτερα μετά την εισαγωγή τους, με χρονικό περιθώριο τις 48 ώρες. Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν βαμβακοφόροι στυλεοί, οι οποίοι διωγράνθηκαν με 2-3 σταγόνες 0.9% NaCl και μεταφέρθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας «Γ. Κ. Δαΐκος» σε διάστημα 30 λεπτών. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν σε McConkey άγαρ No.3 εμπλουτισμένο με μεροπενέμη (0.5 mg/L). Μετά από 48ωρη επώαση στους 37°C ακολούθησε απομόνωση των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν και ταυτοποίησή τους με αυτόματο σύστημα ταυτοποίησης. Όλα τα στελέχη *Enterobacteriales* που απομονώθηκαν, ελέγχθηκαν για την παραγωγή καρβαπενεμασών των τύπων KPC και MBL με φαινοτυπική μεθοδολογία. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν για την παραγωγή καρβαπενεμάσης με τη χρήση δίσκων μεροπενέμης (10μg) εμποτισμένων με EDTA (0.25M), βορονικό οξύ (60 μg/μL) και συνδυασμό των δύο ουσιών, μέθοδος που περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες (S. Rounaras, Poulou, & Tsakris, 2010). Η τελική επιβεβαίωση της παρουσίας γονιδίων που παράγουν καρβαπενεμάσες έγινε με τη μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τις γνωστές καρβαπενεμάσες (VIM, NDM, KPC, OXA-48) που κυκλοφορούν στη χώρα μας. Επιπλέον, μέσω PCR προσδιορίστηκε ο τύπος της μεταλλο-β-λακταμάσης (NDM, VIM) στα δείγματα που προέκυψαν θετικά για MBL με τις φαινοτυπικές μεθόδους.

Για τη σύγκριση των φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων έγινε λήψη ορθικού δείγματος με δύο βαμβακοφόρους στυλεούς σε αναλογία 1 ανά 4 ασθενείς, με τυχαία κατανομή (Οκτώβριος 2015-Μάρτιος 2016). Ο ένας στυλεός χρησιμοποιήθηκε για τις φαινοτυπικές μεθόδους και ο δεύτερος για την μοριακή ανάλυση. Μετά τη λήψη ακολούθησε τοποθέτηση του στυλεού σε ειδικό διάλυμα (lysis buffer) σύμφωνα με τις οδηγίες του QiAamp DNA MiniKit της εταιρείας QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) και στη συνέχεια το απομονωθέν DNA εξετάστηκε για την παρουσία των *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> και *bla*<sub>OXA-48</sub> γονιδίων με multiplex PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές.

### 2.1.7. Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές συγκρίθηκαν με τη χρήση του t-test ή με μη παραμετρικές διαδικασίες (Mann-Whitney U-test). Η σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών έγινε με τη διαδικασία  $\chi^2$  ή έλεγχο Fisher. Η επίδραση των διαφόρων μεταβλητών στην παρουσία CRE εκτιμήθηκε με μονοπαραγοντικά και πολυπαραγοντικά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης. Τιμές  $p \leq 0.05$  υποδηλώνουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών σχέσεων.

Οι μεταβλητές με  $p < 0.2$  στη μονοπαραγοντική ανάλυση επιλέχθηκαν ως υποψήφιες μεταβλητές για τη δημιουργία του πολυπαραγοντικού μοντέλου λογιστικής παλινδρόμησης. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης με προς τα πίσω διαγραφή των μεταβλητών (backward stepwise logistic regression). Όλες οι μεταβλητές με  $p \leq 0.05$  συμπεριλήφθησαν στο τελικό μοντέλο. Το επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία μίας κλίμακας κινδύνου (risk score), με στόχο την απλοποίηση του υπολογισμού του κινδύνου αποικισμού με CPE, ομοίως με προηγουμένως δημοσιευθείσες έρευνες (L. M. Sullivan, Massaro, & D'Agostino, 2004). Στη συγκεκριμένη μέθοδο αποδίδονται σε κάθε μεταβλητή που συμπεριλαμβάνεται στο τελικό μοντέλο «βαθμοί», οι οποίοι είναι ακέραιοι αριθμοί. Αφού προσδιορίστηκαν οι παράμετροι του πολυπαραγοντικού μοντέλου, οι παράγοντες κινδύνου κατηγοριοποιήθηκαν και σε κάθε κατηγορία αποδόθηκαν τιμές αναφοράς. Στη βασική κατηγορία για κάθε παράγοντα κινδύνου αποδόθηκαν 0 βαθμοί του συστήματος βαθμολόγησης (scoring system), ενώ στις κατηγορίες που αντικατόπτριζαν χειρότερη κλινική κατάσταση αποδόθηκαν θετικοί βαθμοί. Οι βαθμοί σε κάθε κατηγορία παραγόντων κινδύνου καθορίστηκαν από τον αντίστοιχο συντελεστή  $\beta$  της παλινδρόμησης (regression coefficient  $\beta$ ) που υπολογίστηκε στο μοντέλο, καθώς και την απόσταση κάθε κατηγορίας από τη βασική κατηγορία. Η εκτίμηση του κινδύνου που σχετίζεται με κάθε σύνολο βαθμών έγινε χρησιμοποιώντας την εξίσωση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης με τους αντίστοιχους συντελεστές παλινδρόμησης.

Η ικανότητα της κλίμακας πρόβλεψης να διαχωρίσει τους φορείς CPE από τους μη αποικισμένους αξιολογήθηκε μέσω της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη ROC (Area under the Curve, AUROC) με το αντίστοιχο 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% confidence interval, CI). Υπολογίστηκε η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και αρνητική προγνωστική αξία για όλα τα πιθανά διαχωριστικά όρια (cut-off points) της κλίμακας. Το όριο με τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα προσδιορίστηκε μέσω του δείκτη Youden (Youden index,  $J = \text{ευαισθησία} + \text{ειδικότητα} - 1$ ). Οι τιμές που μπορεί να λάβει ο δείκτης έχουν εύρος από 0 ως 1, όπου το 1 υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά,

δηλαδή η δοκιμασία είναι τέλεια. Το διαχωριστικό όριο της κλίμακας όπου ο δείκτης Youden λαμβάνει τη μέγιστη δυνατή τιμή του είναι το βέλτιστο όριο. Επιπλέον έγινε γραφική αναπαράσταση της βαθμονόμησης (calibration) της κλίμακας πρόβλεψης, δηλαδή της συμφωνίας μεταξύ των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων και των προβλέψεων, με χρήση του σημείου τομής και της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης (calibration intercept and slope).

Κατά τη 2<sup>η</sup> φάση της μελέτης, η κλίμακα πρόβλεψης που δημιουργήθηκε με βάση τον πληθυσμό προέλευσης (derivation population) εφαρμόστηκε στον πληθυσμό επικύρωσης (validation population) σε δεύτερο χρόνο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ένας εξωτερικός έλεγχος εγκυρότητας. Η προγνωστική επίδοση της κλίμακας στην ομάδα ελέγχου αξιολογήθηκε με τις ίδιες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον πληθυσμό προέλευσης.

### 3. Αποτελέσματα

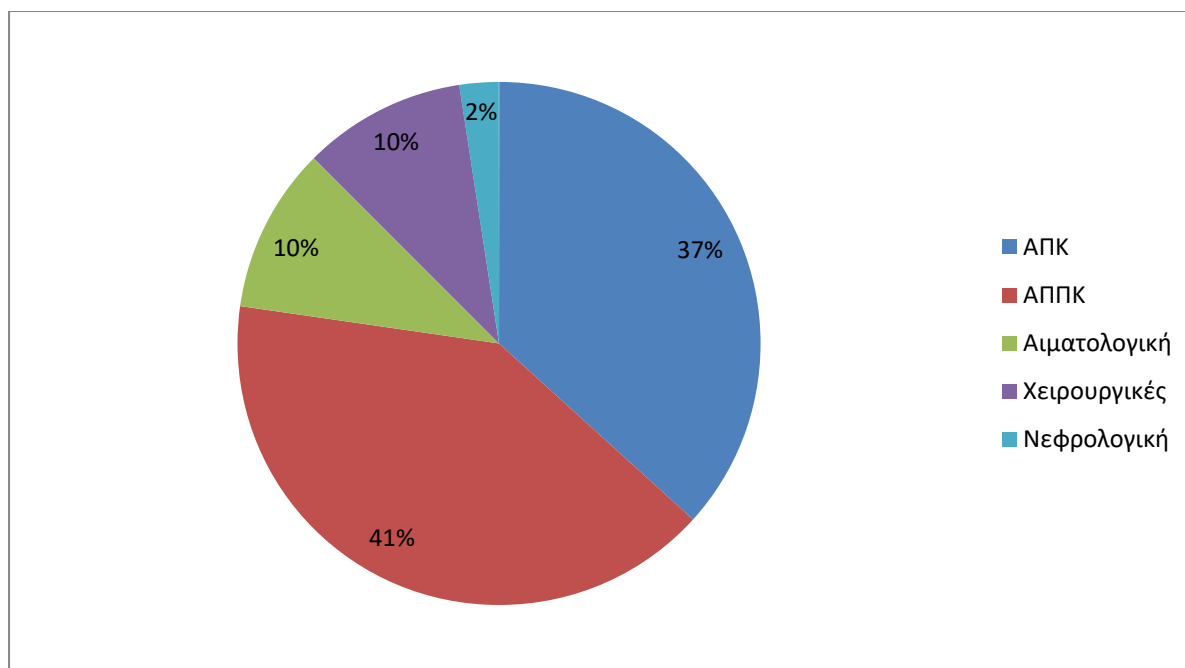
#### 3.1. Προσδιορισμός παραγόντων κινδύνου αποικισμού με στελέχη *Enterobacterales* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) ασθενών που εισάγονται σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο

##### 3.1.1. Βασικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της έρευνας

###### i. Πληθυσμός προέλευσης (derivation)

Τα βασικά κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά, το ιστορικό και η συννοσηρότητα των συμμετεχόντων ασθενών παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται με τη χρήση της μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης ή διαμέσου και 25<sup>ου</sup> και 75<sup>ου</sup> εκατοστημορίου. Κατά τη χρονική περίοδο από την έναρξη της μελέτης, τον Οκτώβριο 2015 ως και τη λήξη της συλλογής το Μάρτιο 2016, έγινε έλεγχος αποικισμού σε 2,303 ασθενείς, οι οποίοι εισήχθησαν στην Α΄ Παθολογική, Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική, Αιματολογική, Νεφρολογική, Χειρουργική και Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Η κατανομή τους στα τμήματα του νοσοκομείου είχε ως εξής (**διάγραμμα 3**):

1. Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική (ΑΠΠΚ): 934 ασθενείς
2. Α΄ Παθολογική Κλινική (ΑΠΚ): 846 ασθενείς
3. Αιματολογική Κλινική: 235 ασθενείς
4. Νεφρολογική Κλινική: 56 ασθενείς
5. Χειρουργική-Ουρολογική Κλινική: 232 ασθενείς



**Διάγραμμα 3:** Κατανομή ασθενών ανά κλινική στον πληθυσμό προέλευσης

Από τους ασθενείς που συμμετείχαν στον πληθυσμό προέλευσης (derivation, N=2,303), οι 1,227 (53.3%) ήταν άνδρες και η διάμεση ηλικία ήταν τα 73 έτη (interquartile range 59.8-81 χρόνια). Σχεδόν οι μισοί ασθενείς είχαν ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας κατά το προηγούμενο εξάμηνο (49.2%), και 1,462 (63.6%) ασθενείς είχαν εκτεθεί σε κάποιον αντιβιοτικό παράγοντα κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η πιο κοινή υποκείμενη πάθηση ήταν ο σακχαρώδης διαβήτης (21.5%) ενώ 522 ασθενείς είχαν περισσότερα από 3 υποκείμενα νοσήματα, βάσει της κλίμακας Charlson ( $CCI \geq 3$ ).

Από τους ασθενείς που ελέγχθησαν, 98 βρέθηκαν αποικισμένοι με Εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες (CPE) (**4.3%**). Μεταξύ των δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά για συγκεκριμένα γονίδια καρβαπενεμάσης, η πλειοψηφία (n = 79, 80.6%) παρήγαγε *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), ακολουθούμενη από στελέχη που παρήγαγαν Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM) (n = 9, 9.2%) και New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) (n = 8, 8.2%). Ένα μόνο στέλεχος ήταν θετικό σε *bla<sub>OXA-48</sub>*, ενώ άλλο ένα παρήγαγε περισσότερες από μία καρβαπενεμάσες (*bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>NDM</sub>*). Η κατανομή των ασθενών και των απομονωθέντων στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάση παρουσιάζεται στον **πίνακα 8**.



Κλινικές	Αριθμός ασθενών που εξετάστηκαν	Αριθμός αποικισμένων με CPE, n (%)	Βακτηριαμιά, n (% επί των αποικισμένων)	Είδος καρβαπενεμάσης	n
ΑΠΚ	846	43 (5.1)	5 (11.6)	KPC	37
				VIM	3
				NDM	2
				περισσότερες από 1	1
ΑΠΠΚ	934	37 (4.0)	2 (5.4)	KPC	28
				VIM	4
				NDM	4
				OXA-48	1
Αιματολογική	235	6 (2.6)	2 (33.3)	KPC	4
				VIM	2
Χειρουργικές	232	6 (2.6)	0	KPC	5
				NDM	1
Νεφρολογική	56	6 (10.7)	0	KPC	5
				NDM	1
<b>Σύνολο</b>	<b>2303</b>	<b>98 (4.3)</b>	<b>11 (11.2%)</b>	<b>KPC</b>	<b>79</b>
				<b>VIM</b>	<b>9</b>
				<b>NDM</b>	<b>8</b>
				<b>OXA-48</b>	<b>1</b>
				<b>περισσότερες από 1</b>	<b>1</b>

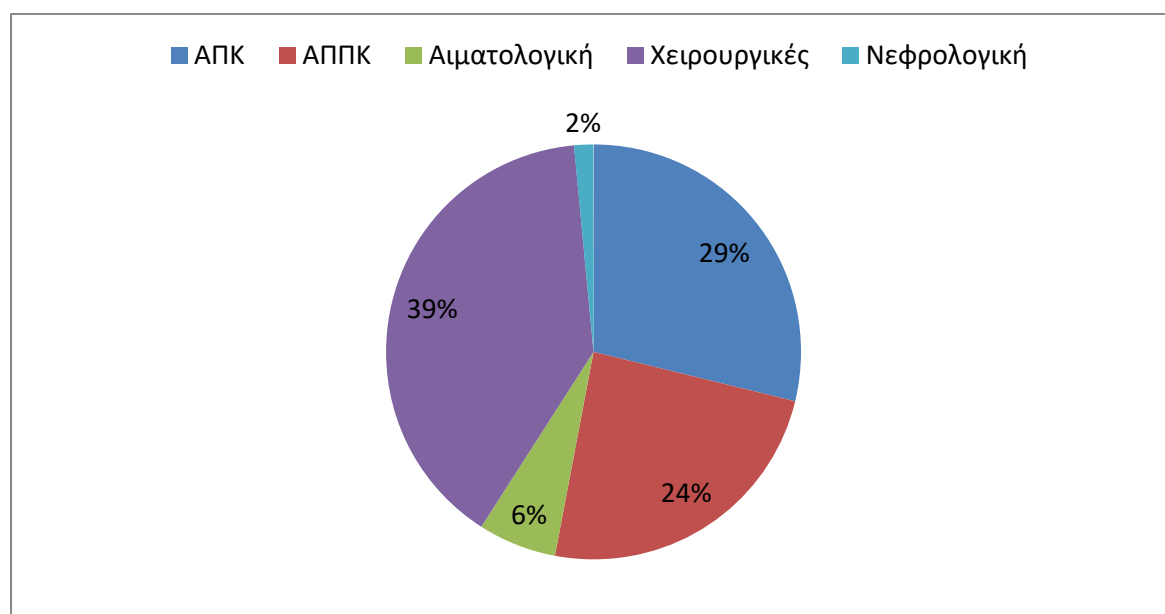
**Πίνακας 8:** Κατανομή ασθενών και καρβαπενεμασών ανά κλινική στον πληθυσμό προέλευσης (derivation)

ii. Πληθυσμός επικύρωσης (validation)

Τα βασικά κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά, το ιστορικό και η συννοσηρότητα των ασθενών στον πληθυσμό επικύρωσης παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**.

Κατά τη χρονική περίοδο δειγματοληψίας (Αύγουστος-Δεκέμβριος 2016), έγινε έλεγχος σε 1,391 ασθενείς οι οποίοι εισήχθησαν στα συμμετέχοντα τμήματα. Η κατανομή τους είχε ως εξής (διάγραμμα 4):

1. Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική (ΑΠΠΚ): 336 ασθενείς
2. Α΄ Παθολογική Κλινική (ΑΠΚ): 401 ασθενείς
3. Αιματολογική Κλινική: 85 ασθενείς
4. Νεφρολογική Κλινική: 21 ασθενείς
5. Χειρουργική-Ουρολογική Κλινική: 548 ασθενείς



**Διάγραμμα 4:** Κατανομή ασθενών ανά κλινική στον πληθυσμό επικύρωσης

Από τον έλεγχο 1,391 ασθενών, 87 ασθενείς (6.3%) βρέθηκαν αποικισμένοι με Εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες (CPE), οι 51 από τους οποίους (58.6%) ήταν θετικοί για KPC. Ο σημαντικά υψηλότερος επιπολασμός CPE στον πληθυσμό επικύρωσης θα μπορούσε να αποδοθεί στην αληθή αύξηση της επίπτωσης CPKp που παρατηρήθηκε στα ελληνικά νοσοκομεία με κορύφωση κατά το β΄ μισό του 2016 (the WHONET Study Group). Σε σύγκριση με τον πληθυσμό προέλευσης, παρατηρείται επίσης μία αύξηση στο ποσοστό των στελεχών που παρήγαγαν NDM (19.5% έναντι 8.2% στον πληθυσμό προέλευσης), γεγονός που ακολουθεί την επιδημιολογική τάση της CPKp (Galani et al., 2018). 8 στελέχη (9.2%) αναγνωρίστηκαν ως παράγοντα VIM και 4 (4.6%), ως παράγοντα OXA-48. 7 στελέχη (8.0%) παρήγαγαν περισσότερες από μία καρβαπενεμάσες.

Η κατανομή των ασθενών και των στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες στα διάφορα τμήματα στον πληθυσμό επικύρωσης παρουσιάζεται στον **πίνακα 9**.

Κλινικές	Αριθμός ασθενών που εξετάστηκαν	Αριθμός αποικισμένων με CPE, n (%)	Βακτηριαμιά, n (% επί των αποικισμένων)	Είδος καρβαπενεμάσης	N
ΑΠΚ	401	27 (6.7)	3 (11.1)	KPC	17
				VIM	2
				NDM	2
				OXA-48	3
				περισσότερες από 1	3
ΑΠΠΚ	336	30 (8.9)	3 (10)	KPC	16
				VIM	4
				NDM	9
				OXA-48	1
Αιματολογική	85	11 (12.9)	2 (18)	KPC	5
				VIM	1
				NDM	4
				περισσότερες από 1	1
Χειρουργικές	548	18 (3.3)	5 (27)	KPC	13
				VIM	1
				NDM	2
				περισσότερες από 1	2
Νεφρολογική	21	1 (4.8)	1 (100)	περισσότερες από 1	1
Σύνολο	1391	87 (6.3)	14 (16.1%)	KPC	51
				VIM	8
				NDM	17
				OXA-48	4
				περισσότερες από 1	7

**Πίνακας 9:** Κατανομή ασθενών και καρβαπενεμασών ανά κλινική στον πληθυσμό επικύρωσης (validation)

**Πίνακας 10:** Συγκριτικός πίνακας των χαρακτηριστικών του πληθυσμού προέλευσης (derivation) και επικύρωσης (validation)

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Πληθυσμός προέλευσης (derivation) N=2,303</b>	<b>Πληθυσμός επικύρωσης (validation) N=1,391</b>	<b>p-value</b>
Ηλικία (έτη), μέση τιμή, (τυπική απόκλιση, SD)	68.6 (17.2)	66.0 (17.4)	<0.001 <sup>a</sup>
Ηλικία (έτη), διάμεσος, (25 <sup>η</sup> -75 <sup>η</sup> )	73 (60 – 81)	69 (56 – 79)	<0.001 <sup>b</sup>
Φύλο, n (%)			0.046 <sup>c</sup>
Ανδρας	1,227 (53.3)	788 (56.6)	
Γυναίκα	1,076 (46.7)	603 (43.4)	
<b>Κλινική, n (%)</b>			<0.001 <sup>c</sup>
Παθολογικές	1,780 (77.3)	737 (53.0)	
Χειρουργικές	232 (10.1)	548 (39.4)	
Αιματολογική	235 (10.2)	85 (6.1)	
Νεφρολογική	56 (2.4)	21 (1.5)	
Μεταφορά από άλλη εγκατάσταση υγείας, n (%)	207 (9.0)	72 (5.2)	<0.001 <sup>c</sup>
Προηγούμενος αποικισμός ή λοίμωξη από CPE, n (%)	57 (2.5)	24 (1.7)	0.132 <sup>c</sup>
<b>Ιστορικό</b>			
Πρόσφατη νοσηλεία <sup>d</sup> , n (%)	1,134 (49.2)	648 (46.6)	0.118 <sup>c</sup>
Διάρκεια προηγούμενης νοσηλείας ≥ 10 ημέρες, n (%)	699 (30.8)	325 (23.4)	<0.001 <sup>c</sup>
Πρόσφατη εισαγωγή σε ΜΕΘ <sup>d</sup> , n (%)	34 (1.5)	26 (1.9)	0.360 <sup>c</sup>
Διαμονή σε κέντρο αποκατάστασης ή γηροκομείο, n (%)	62 (2.7)	29 (2.1)	0.249 <sup>c</sup>
Πρόσφατη χειρουργική επέμβαση <sup>d</sup> , n (%)	219 (9.5)	152 (10.9)	0.167 <sup>c</sup>
Πρόσφατη αντιβιοτική αγωγή (οποιοδήποτε είδος) <sup>d</sup> , n (%)	1,462 (63.6)	737 (53.0)	<0.001 <sup>c</sup>
Χημειοθεραπεία <sup>d</sup> , n (%)	449 (19.6)	208 (15.1)	0.001 <sup>c</sup>
			<0.001 <sup>c</sup>
Ανοσοκατασταλτική θεραπεία <sup>d</sup> , n (%)	601 (26.2)	215 (15.6)	

Χαρακτηριστικά	Πληθυσμός προέλευσης	Πληθυσμός επικύρωσης	p-value
	(derivation) N=2,303	(validation) N=1,391	
<b>Παρεμβατικές διαδικασίες<sup>d</sup></b>			
Κεντρικός φλεβικός καθετήρας, n (%)	324 (14.4)	150 (10.8)	0.002
Παρεμβάσεις γαστρεντερικού <sup>e</sup> , n (%)	320 (14.2)	238 (17.1)	0.017 <sup>e</sup>
Παρεμβάσεις ουροποιητικού <sup>f</sup> , n (%)	546 (24.3)	362 (26.0)	0.241 <sup>e</sup>
Παρεμβάσεις αναπνευστικού <sup>g</sup> , n (%)	64 (2.8)	31 (2.2)	0.269 <sup>e</sup>
Αιμοκάθαρση, n (%)	52 (2.3)	22 (1.6)	0.136 <sup>e</sup>
Τοποθέτηση χειρουργικής παροχής, n (%)	154 (6.8)	80 (5.8)	0.195 <sup>e</sup>
<b>Στην εισαγωγή</b>			
Παρουσία οποιουδήποτε καθετήρα, n (%)	376 (16.3)	199 (14.3)	0.100 <sup>e</sup>
Έλκος κατάκλισης, n (%)	129 (5.6)	91 (6.5)	0.244 <sup>e</sup>
Karnofsky score, διάμεσος, (25 <sup>nl</sup> -75 <sup>nl</sup> )	80 (50 – 100)	90 (80 – 100)	<0.001 <sup>b</sup>
<b>Συννοσηρότητα</b>			
Αγγειακή εγκεφαλική νόσος, n (%)	253 (11.0)	108 (7.8)	0.001 <sup>e</sup>
Καρδιακή ανεπάρκεια, n (%)	153 (6.7)	86 (6.2)	0.558 <sup>e</sup>
Έμφραγμα μυοκαρδίου, n (%)	227 (9.9)	94 (6.8)	0.001 <sup>e</sup>
Χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια, n (%)	278 (12.1)	155 (11.1)	0.373 <sup>e</sup>
Ηπατική νόσος, n (%)	75 (3.3)	22 (1.6)	0.002 <sup>e</sup>
Περιφερική αγγειακή νόσος, n (%)	161 (7.0)	111 (8.0)	0.282 <sup>e</sup>
Άνοια, n (%)	168 (7.3)	107 (7.7)	0.685 <sup>e</sup>
Σακχαρώδης διαβήτης, n (%)	492 (21.5)	276 (19.8)	0.234 <sup>e</sup>
Σακχαρώδης διαβήτης με βλάβη οργάνου-στόχου, n (%)	99 (4.3)	37 (2.7)	0.009 <sup>e</sup>
Πεπτικό έλκος, n (%)	105 (4.6)	35 (2.5)	0.001 <sup>e</sup>
Νόσος συνδετικού ιστού, n (%)	134 (5.8)	62 (4.5)	0.069 <sup>e</sup>
Νεφρική νόσος, n (%)	33 (1.5)	55 (4.0)	<0.001 <sup>e</sup>
Ημipληγία, n (%)	56 (2.4)	16 (1.2)	0.006 <sup>e</sup>
Όγκος, n (%)	334 (14.6)	226 (16.2)	0.173 <sup>e</sup>
Αιματολογική κακοήθεια <sup>h</sup> , n (%)	389 (17.0)	187 (13.4)	0.004 <sup>e</sup>
Μεταστάσεις, n (%)	154 (6.7)	116 (8.3)	0.067 <sup>e</sup>
HIV/AIDS, n (%)	4 (0.2)	2 (0.1)	0.822 <sup>i</sup>

Δείκτης Charlson >3, n (%)	522 (22.8)	261 (18.8)	0.004 <sup>c</sup>
Χαρακτηριστικά	Πληθυσμός προέλευσης (derivation)	Πληθυσμός επικύρωσης (validation)	p-value
	N=2,303	N=1,391	
	<b>Εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν καρβαπενεμάση (CPE)</b>		
Επιπολασμός CPE, n (%)	98 (4.3)	87 (6.3)	0.003 <sup>c</sup>
Τύπος καρβαπενεμάσης, n, (% των CPE)			0.003 <sup>1</sup>
KPC, n (%)	79 (80.6)	51 (58.6)	
VIM, n (%)	9 (9.2)	8 (9.2)	
NDM, n (%)	8 (8.2)	17 (19.5)	
OXA-48, n (%)	1 (1.0)	4 (4.6)	
> 1, n (%)	1 (1.0)	7 (8.0)	
<b>Εξέλιξη σε μικροβιαμία, n (%)</b>	11 (11.2)	14 (16.1)	

<sup>a</sup>Student's t-test, <sup>b</sup>Mann-Whitney U test, <sup>c</sup>Chi-squared test, <sup>d</sup>Κατά τη διάρκεια του τελευταίου 6μήνου, <sup>e</sup>Οι παρεμβάσεις του γαστρεντερικού περιλαμβάνουν την εισαγωγή ρινογαστρικού καθετήρα, τη διενέργεια οισοφαγοαστροδωδεκαδακτυλοσκόπησης, κολonosκόπησης, ενδοσκοπικής ανάστροφης παγκρεατοχολαγγειογραφίας με ή χωρίς τοποθέτηση στεντ και η τοποθέτηση γαστροστομίας, <sup>f</sup>Οι παρεμβάσεις του ουροποιητικού περιλαμβάνουν την τοποθέτηση ουροκαθετήρα, νεφρικού στεντ, την κυστεοσκόπηση, τη βιοψία προστάτη και την τοποθέτηση νεφροστομίας, <sup>g</sup>Οι παρεμβάσεις του αναπνευστικού περιλαμβάνουν τη διασωλήνωση και τη διενέργεια βρογχοσκόπησης, <sup>h</sup>Η αιματολογική κακοήθεια περιλαμβάνει τη λευχαιμία και το λέμφωμα <sup>1</sup>Fisher's exact test

### 3.1.2. Παράγοντες κινδύνου αποικισμού ασθενών με CPE κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο

Βάσει των αποτελεσμάτων της πολυπαραγοντικής ανάλυσης, 7 μεταβλητές ταυτοποιήθηκαν ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου αποικισμού από CPE κατά την εισαγωγή των ασθενών στο νοσοκομείο: Η κλίμακα Karnofsky (ανά 10 μονάδες, OR = 0.99, 95% CI: 0.98-0.9996,  $p = 0.041$ ), το ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας (βραχυπρόθεσμη, δηλαδή για < 10 μέρες vs. όχι προηγούμενη νοσηλεία: OR = 3.11, 95% CI: 1.32-7.35,  $p = 0.01$  και μακροπρόθεσμη, δηλ. για > 10 μέρες vs. όχι προηγούμενη νοσηλεία: OR = 7.40, 95% CI: 3.57-15.34,  $p < 0.001$ ), η διαμονή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας ή σε γηροκομείο (OR = 3.32, 95% CI: 1.44-7.65,  $p = 0.005$ ), ο γνωστός αποικισμός ή λοίμωξη

από CPE στο παρελθόν (OR = 6.08, 95% CI: 3.17-11.64,  $p < 0.001$ ), το ιστορικό διενέργειας  $\geq 2$  διαφορετικών παρεμβατικών διαδικασιών κατά την προηγούμενη νοσηλεία (OR = 1.84, 95% CI: 1.11-3.05,  $p = 0.018$ ), η αιμοκάθαρση κατά το τελευταίο 6μηνο (OR = 2.84, 95% CI: 1.21-6.61,  $p = 0.015$ ), και η συννοσηρότητα με διαβήτη με παρουσία βλάβης τελικού οργάνου-στόχου (OR = 3.1, 95% CI: 1.46-6.57,  $p = 0.003$ ) (Πίνακας 11, Διάγραμμα 5).

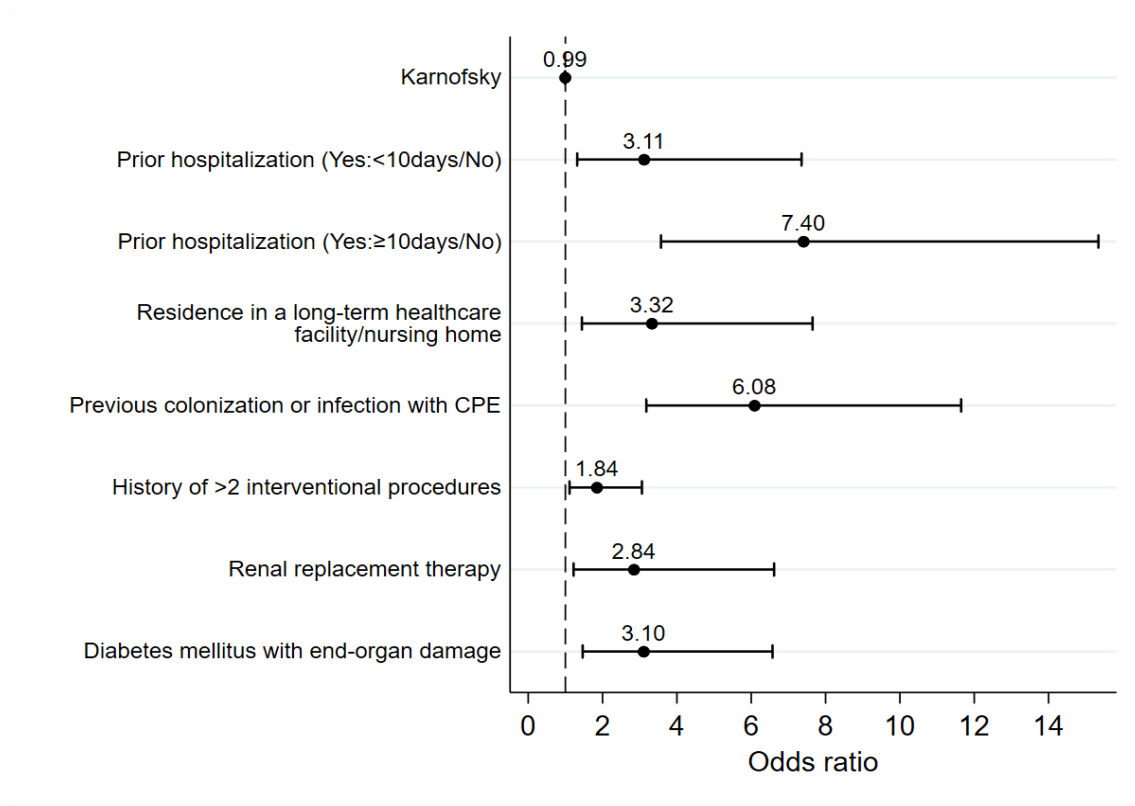
**Πίνακας 11:** Πολυπαραγοντική ανάλυση παραγόντων κινδύνου αποικισμού με CPE κατά την εισαγωγή σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο και αντίστοιχη βαθμολογία

	Odds ratio (OR)	95% Confidence Interval	P	Βαθμοί
<b>Κλίμακα Karnofsky</b>	0.99	0.98-1.0	0.041	
90 – 100				0
70 – 80				2
50 – 60				4
30 – 40				6
10 – 20				8
<b>Ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας</b>				
Όχι	Ref. <sup>a</sup>			0
Ναι: < 10 μέρες	3.11	1.32-7.35	0.010	13
Ναι: $\geq 10$ μέρες	7.40	3.57-15.34	<0.001	23
<b>Διαμονή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας ή γηροκομείο</b>				
Όχι	Ref.			0
Ναι	3.32	1.44-7.65	0.005	14
<b>Προηγούμενος αποικισμός ή λοίμωξη από CPE<sup>b</sup></b>				
Όχι	Ref.			0
Ναι	6.08	3.17-11.64	<0.001	21
<b>Ιστορικό διενέργειας <math>\geq 2</math> παρεμβάσεων<sup>b</sup></b>				
Όχι	Ref.			0
Ναι	1.84	1.11-3.05	0.018	7
<b>Ιστορικό αιμοκάθαρσης<sup>b</sup></b>				
Όχι	Ref.			0
Ναι	2.84	1.21-6.61	0.015	12
<b>Διαβήτης με βλάβη οργάνου-στόχου</b>				
Όχι	Ref.			0
Ναι	3.10	1.46-6.57	0.003	13

<sup>a</sup> Συντομογραφία: Ref., Reference category (κατηγορία αναφοράς): OR=1.00

<sup>b</sup> Κατά τη διάρκεια του τελευταίου εξαμήνου

**Διάγραμμα 5:** Παράγοντες κινδύνου αποικισμού με CPE ασθενών κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο: Οι σχετικοί κίνδυνοι (odds ratio) και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίστηκαν μέσω πολυπαραγοντικής ανάλυσης λογιστικής παλινδρόμησης

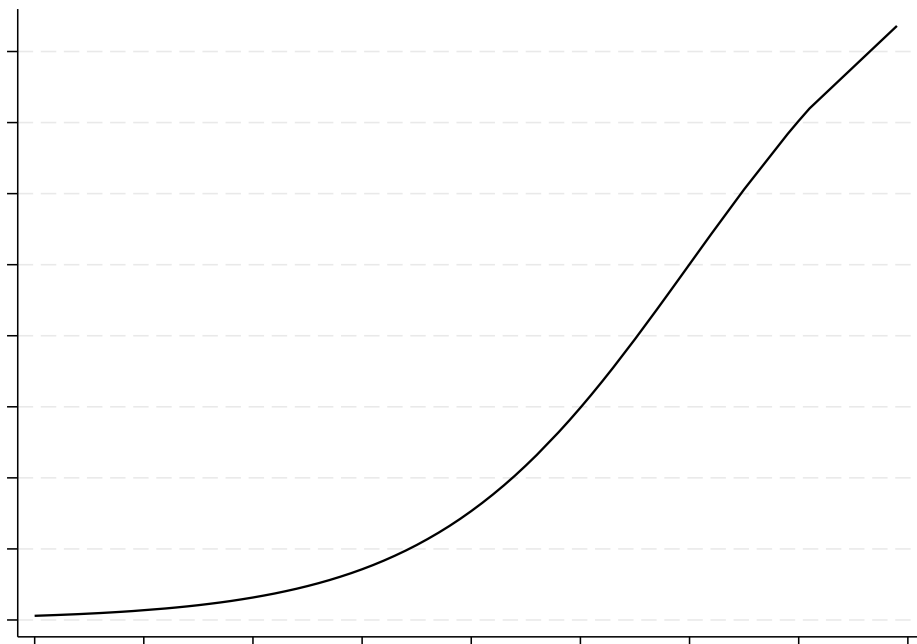


### 3.2. Δημιουργία μιας κλίμακας κινδύνου (risk score) για αποικισμό με CPE βασισμένης στους παράγοντες κινδύνου

#### Δημιουργία και επικύρωση της κλίμακας κινδύνου

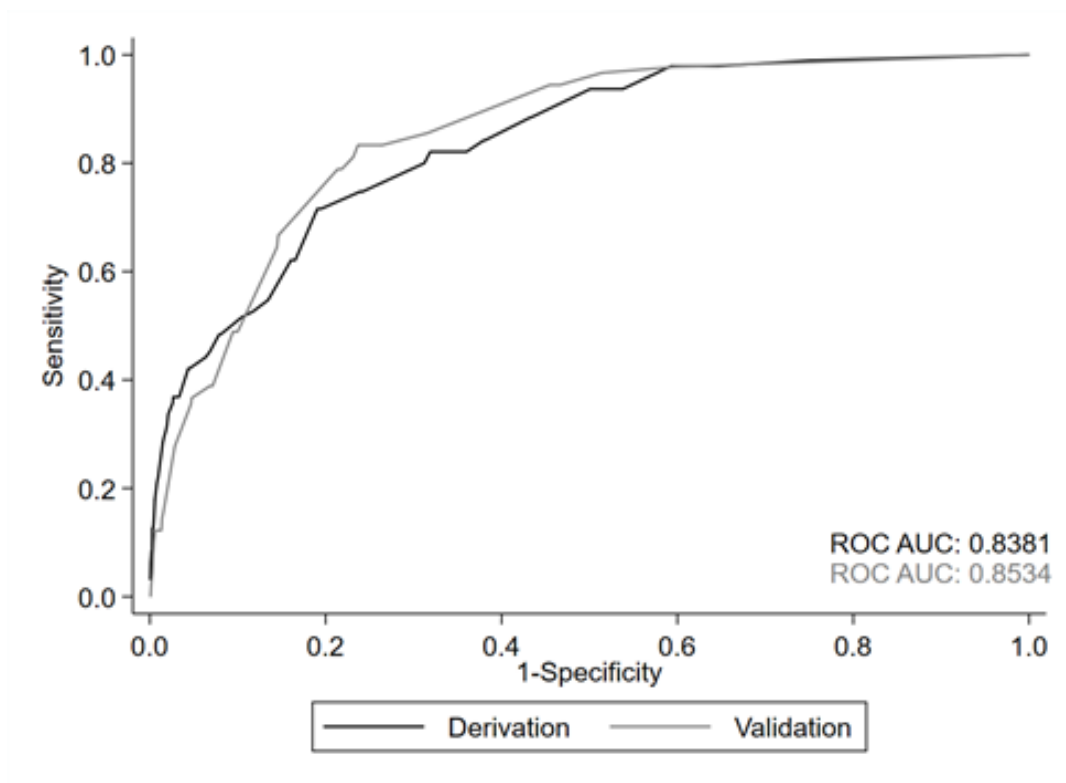
Σε κάθε παράγοντα κινδύνου που βρέθηκε να σχετίζεται ανεξάρτητα με αποικισμό από CPE αποδόθηκε μία σταθμισμένη βαθμολογία, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**. Η συνολική βαθμολογία έχει εύρος από 0-79 βαθμούς στον πληθυσμό προέλευσης, με αντίστοιχο εκτιμητέο κίνδυνο 0.6% έως 83.6% (**πίνακας 12**). Για παράδειγμα, ένας ασθενής με βαθμό στην κλίμακα Karnofsky 20, ο οποίος βρίσκεται σε αιμοκάθαρση και έχει ιστορικό παρατεταμένης νοσηλείας με τουλάχιστον 2 παρεμβάσεις έχει μία βαθμολογία ίση με 50 στην κλίμακα. Ο εκτιμητέος κίνδυνος αποικισμού με CPE για τον ασθενή αυτό θα ήταν 29.9% (**Διάγραμμα 6**).





**Διάγραμμα 6:** Εκτίμηση κινδύνου αποικισμού με CPE στον πληθυσμό προέλευσης σε σχέση με την κλίμακα κινδύνου (risk score) που δημιουργήθηκε με βάση τους ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου που ταυτοποιήθηκαν

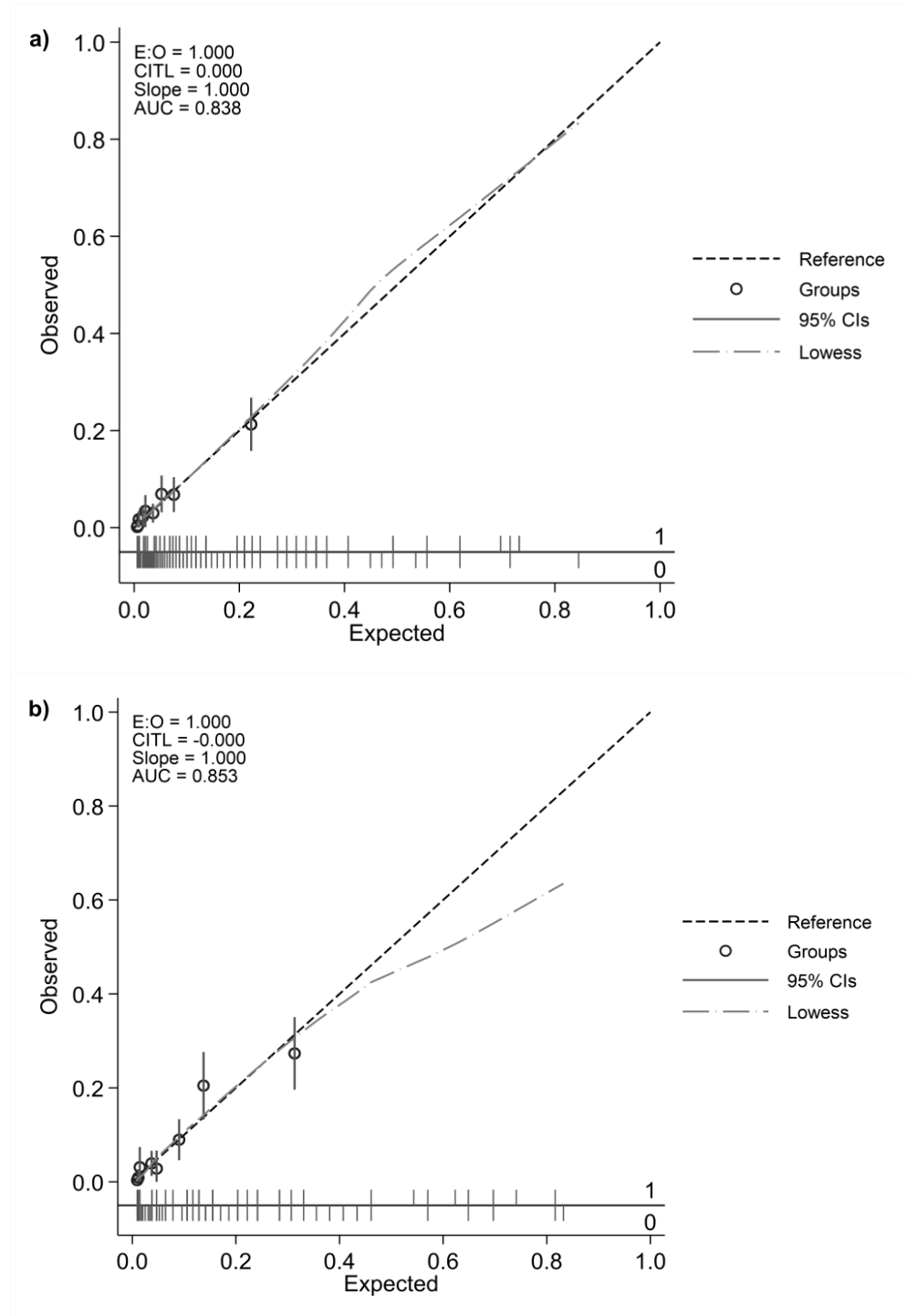
Η αξιολόγηση της απόδοσης του προγνωστικού μοντέλου έγινε με την AUC της καμπύλης ROC (Receiver Operating Characteristic), η οποία ήταν **0.84** (95% CI: 0.80-0.88) στον πληθυσμό προέλευσης, υποδεικνύοντας ότι το μοντέλο επιδεικνύει εξαιρετική προγνωστική αξία (**Διάγραμμα 7**). Στον **πίνακα 12** φαίνεται η επίδοση της κλίμακας κινδύνου στον πληθυσμό προέλευσης ανά διαφορετικούς ουδούς (cut-off points). Το προγνωστικό μοντέλο λειτούργησε βέλτιστα στον ουδό (cut-off) των 27 βαθμών της κλίμακας, με ευαισθησία 72% και ειδικότητα 81%, βάσει του δείκτη Youden. Συνεπώς η διενέργεια δειγματοληψίας μόνο σε όσους ασθενείς θα είχαν βαθμολογία  $\geq 27$ , θα αναγνώριζε αληθώς περίπου 72% των αποικισμένων με CPE ασθενών. Η πιθανότητα αποικισμού για τους ασθενείς με μία «θετική» βαθμολογία (με όριο τους 27 βαθμούς) θα ήταν 14.5% (positive predictive value, PPV), σταδιακά αυξανόμενη για υψηλότερους ουδούς (**Πίνακας 12**). Η συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων βάσει της κλίμακας κινδύνου πιθανοτήτων παρουσιάζεται στο **διάγραμμα 8a**. Η βαθμονόμηση (calibration) της κλίμακας στον πληθυσμό προέλευσης ήταν σχεδόν τέλεια.



**Διάγραμμα 7:** Καμπύλες receiver-operating characteristic (ROC) στον πληθυσμό προέλευσης (derivation) και τον πληθυσμό επικύρωσης (validation).

Επιπλέον, υπολογίστηκε η διακριτική ικανότητα και η βαθμονόμηση της κλίμακας κινδύνου στον πληθυσμό ελέγχου. Η AUC ήταν 0.85 (95% CI: 0.82-0.89), δηλαδή παρόμοια με την AUC του πληθυσμού προέλευσης (**διάγραμμα 8b**) και η κλίμακα κινδύνου επέδειξε καλή βαθμονόμηση (calibration). Στον **πίνακα 13** παρουσιάζεται η επίδοση της κλίμακας σε διάφορους ουδούς. Η χρήση του ουδού των 27 βαθμών στον πληθυσμό ελέγχου εγκυρότητας θα αντιστοιχούσε στον έλεγχο αποικισμού 88 ασθενών ανά 1000 εισαγωγές και θα αναγνώριζε το 48.9% των αποικισμένων ασθενών (30/63). Η χρήση ενός χαμηλότερου ουδού (π.χ. >20) θα είχε ως αποτέλεσμα τη διενέργεια 216 ελέγχων αποικισμού ανά 1000 εισαγωγές και την αληθή αναγνώριση 81% των αποικισμένων ασθενών (51/63).

**Διάγραμμα 8:** Βαθμονόμηση της κλίμακας κινδύνου, με υπολογισμό της συμφωνίας μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων πιθανοτήτων α) στον πληθυσμό προέλευσης και β) στον πληθυσμό επικύρωσης. Η ιδανική γραμμή των 45 μοιρών (γραμμή αναφοράς, reference) έχει σημείο τομής (intercept) 0 και κλίση (slope) 1. Οι κύκλοι υποδεικνύουν αποτελέσματα για τα δεκατημόρια (deciles) των προβλέψεων με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% CI). Η εξομάλυνση των αποκλίσεων μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων πιθανοτήτων απεικονίστηκε διαγραμματικά μέσω της συνάρτησης σταθμισμένης παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων (locally weighted regression-lowess). Οι αιχμές (spikes) στο κάτω μέρος υποδεικνύουν προβλέψεις για τους ασθενείς με και χωρίς CPE.



Πίνακας 12: Επίδοση του μοντέλου σε διαφορετικούς ουδούς (cut-offs) στον πληθυσμό προέλευσης (derivation)

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	False positive	False negative
0	100.00	0.00	4.32	.	100.00	0.00
2	98.95	24.95	5.62	99.81	75.05	1.05
4	97.89	35.36	6.40	99.73	64.64	2.11
6	97.89	40.73	6.94	99.77	59.27	2.11
7	93.68	46.20	7.29	99.39	53.80	6.32
8	93.68	46.44	7.32	99.39	53.56	6.32
9	93.68	49.57	7.74	99.43	50.43	6.32
12	93.68	49.62	7.75	99.43	50.38	6.32
13	93.68	49.90	7.79	99.43	50.10	6.32
14	88.42	56.65	8.43	99.09	43.35	11.58
15	88.42	56.75	8.45	99.09	43.25	11.58
16	84.21	61.88	9.07	98.86	38.12	15.79
17	84.21	62.02	9.10	98.86	37.98	15.79
18	82.11	63.97	9.33	98.75	36.03	17.89
19	82.11	64.31	9.41	98.76	35.69	17.89
20	82.11	66.49	9.96	98.80	33.51	17.89
21	82.11	67.16	10.14	98.81	32.84	17.89
22	82.11	68.11	10.41	98.83	31.89	17.89
23	80.00	68.77	10.37	98.70	31.23	20.00
24	74.74	75.81	12.24	98.52	24.19	25.26
25	74.74	76.09	12.37	98.52	23.91	25.26
26	71.58	80.51	14.23	98.43	19.49	28.42
<b>27</b>	<b>71.58</b>	<b>80.94</b>	<b>14.50</b>	<b>98.44</b>	<b>19.06</b>	<b>28.42</b>
28	62.11	83.46	14.50	97.99	16.54	37.89
29	62.11	83.94	14.86	98.00	16.06	37.89
30	54.74	86.55	15.52	97.69	13.45	45.26
31	52.63	88.26	16.84	97.63	11.74	47.37
32	51.58	89.54	18.22	97.62	10.46	48.42
33	48.42	91.92	21.30	97.53	8.08	51.58
34	48.42	92.11	21.70	97.53	7.89	51.58
35	45.26	93.16	22.99	97.42	6.84	54.74
36	44.21	93.63	23.86	97.38	6.37	55.79
37	42.11	95.48	29.63	97.34	4.52	57.89
38	42.11	95.63	30.30	97.34	4.37	57.89
39	36.84	96.67	33.33	97.13	3.33	63.16
40	36.84	96.72	33.65	97.14	3.28	63.16
41	36.84	96.82	34.31	97.14	3.18	63.16
42	36.84	96.91	35.00	97.14	3.09	63.16
43	36.84	97.34	38.46	97.15	2.66	63.16

<b>Cutpoint</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>	<b>Positive predictive value</b>	<b>Negative predictive value</b>	<b>False positive</b>	<b>False negative</b>
<b>44</b>	35.79	97.39	38.20	97.11	2.61	64.21
<b>45</b>	33.68	97.91	42.11	97.03	2.09	66.32
<b>46</b>	31.58	98.05	42.25	96.95	1.95	68.42
<b>48</b>	30.53	98.19	43.28	96.90	1.81	69.47
<b>49</b>	29.47	98.38	45.16	96.86	1.62	70.53
<b>50</b>	28.42	98.53	46.55	96.82	1.47	71.58
<b>51</b>	22.11	99.05	51.22	96.57	0.95	77.89
<b>52</b>	21.05	99.19	54.05	96.53	0.81	78.95
<b>53</b>	17.89	99.43	58.62	96.41	0.57	82.11
<b>55</b>	14.74	99.52	58.33	96.28	0.48	85.26
<b>57</b>	12.63	99.62	60.00	96.19	0.38	87.37
<b>58</b>	12.63	99.67	63.16	96.19	0.33	87.37
<b>59</b>	12.63	99.71	66.67	96.19	0.29	87.37
<b>61</b>	8.42	99.76	61.54	96.02	0.24	91.58
<b>62</b>	8.42	99.81	66.67	96.02	0.19	91.58
<b>65</b>	7.37	99.86	70.00	95.98	0.14	92.63
<b>69</b>	6.32	99.90	75.00	95.94	0.10	93.68
<b>70</b>	4.21	99.90	66.67	95.85	0.10	95.79
<b>71</b>	3.16	99.95	75.00	95.81	0.05	96.84
<b>79</b>	0.00	99.95	0.00	95.68	0.05	100.00

Πίνακας 13: Επίδοση του μοντέλου σε διαφορετικούς ουδούς στον πληθυσμό επικύρωσης (validation)

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	False positive	False negative
0	100.00	0.00	6.47	.	100.00	0.00
2	97.78	40.20	10.16	99.62	59.80	2.22
4	96.67	48.58	11.51	99.53	51.42	3.33
6	94.44	53.34	12.28	99.28	46.66	5.56
7	94.44	53.50	12.32	99.29	46.50	5.56
9	94.44	53.88	12.41	99.29	46.12	5.56
11	94.44	53.96	12.43	99.29	46.04	5.56
12	94.44	54.11	12.46	99.29	45.89	5.56
13	94.44	54.50	12.56	99.30	45.50	5.56
15	85.56	68.41	15.78	98.56	31.59	14.44
16	83.33	73.56	17.90	98.46	26.44	16.67
17	83.33	73.71	17.99	98.46	26.29	16.67
18	83.33	76.33	19.58	98.51	23.67	16.67
20	81.11	76.86	19.52	98.33	23.14	18.89
22	78.89	78.17	20.00	98.17	21.83	21.11
23	78.89	78.63	20.34	98.18	21.37	21.11
24	66.67	85.40	24.00	97.37	14.60	33.33
25	64.44	85.55	23.58	97.21	14.45	35.56
26	48.89	90.01	25.29	96.22	9.99	51.11
27	<b>48.89</b>	<b>90.55</b>	<b>26.35</b>	<b>96.24</b>	<b>9.45</b>	<b>51.11</b>
28	38.89	92.85	27.34	95.65	7.15	61.11
29	38.89	93.08	28.00	95.66	6.92	61.11
30	38.89	93.16	28.23	95.66	6.84	61.11
31	36.67	95.23	34.74	95.60	4.77	63.33
32	35.56	95.31	34.41	95.53	4.69	64.44
34	27.78	97.16	40.32	95.11	2.84	72.22
35	15.56	98.46	41.18	94.40	1.54	84.44
36	14.44	98.62	41.94	94.34	1.38	85.56
37	12.22	98.69	39.29	94.20	1.31	87.78
38	12.22	98.77	40.74	94.21	1.23	87.78
39	12.22	99.00	45.83	94.22	1.00	87.78
40	12.22	99.15	50.00	94.23	0.85	87.78
41	12.22	99.39	57.89	94.24	0.61	87.78
44	10.00	99.54	60.00	94.11	0.46	90.00
45	8.89	99.54	57.14	94.05	0.46	91.11
47	7.78	99.62	58.33	93.98	0.38	92.22
48	6.67	99.62	54.55	93.91	0.38	93.33
50	4.44	99.69	50.00	93.78	0.31	95.56
52	2.22	99.85	50.00	93.66	0.15	97.78
56	1.11	99.85	33.33	93.59	0.15	98.89
57	0.00	99.92	0.00	93.53	0.08	100.00

### 3.3. Συγκριτική αξιολόγηση φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ανίχνευσης φορέας με CPE

#### 3.3.1. Χαρακτηριστικά απομονωθέντων στελεχών

Δευτερεύοντα στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η σύγκριση της αποτελεσματικότητας φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση φορέας με CPE. Συνολικά ελέγχθησαν 2,303 ορθικά δείγματα ασθενών για παρουσία CPE με φαινοτυπικές μεθόδους και σε ένα ανά πέντε (1/4) δείγματα, με τυχαία κατανομή, έγινε και έλεγχος με PCR απευθείας στο δείγμα (direct PCR) (N=576).

Από τους ασθενείς που ελέγχθηκαν και με τις δύο μεθόδους ταυτόχρονα (N=576), σε 30 ασθενείς βρέθηκαν γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή καρβαπενεμασών KPC, VIM, NDM ή OXA-48, μέσω PCR απευθείας στο ορθικό δείγμα (30/576, **5.2%**). Στον **πίνακα 14** παρουσιάζονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά των θετικών αυτών ασθενών. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα γονίδια καρβαπενεμασών που έφεραν οι ασθενείς βάσει αποτελέσματος direct PCR και το μικρόβιο που αναπύχθηκε στο τρυβλίο, καθώς και το αποτέλεσμα της μοριακής επιβεβαίωσης στο ανακαλλιέργημα.

Σε όλους τους θετικούς με φαινοτυπικές δοκιμασίες (Boronic acid/EDTA positive) ασθενείς πλην ενός (575/576, 99.8%), υπήρξε συμφωνία της PCR στο ανακαλλιέργημα και των φαινοτυπικών δοκιμασιών, δηλαδή στα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στη δοκιμασία με βορονικό οξύ, βρέθηκε KPC καρβαπενεμάση μέσω PCR στο ανακαλλιέργημα και στα θετικά στη δοκιμασία με EDTA (μεταλλο-β-λακταμάσες) βρέθηκε είτε VIM, είτε NDM καρβαπενεμάση. Για ένα δείγμα κανένα από τα εφαρμοζόμενα φαινοτυπικά τεστ (Boronic acid/EDTA) δεν ήταν θετικό, και μέσω της εφαρμογής PCR έγινε τελικώς εμφανής η ύπαρξη καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48.

**Πίνακας 14:** Χαρακτηριστικά θετικών δειγμάτων με PCR απευθείας στο ορθικό δείγμα (direct PCR).

Αποτέλεσμα direct PCR	Αποτέλεσμα καλλιέργειας	Αποτέλεσμα PCR στο ανακαλλιέργημα	Αριθμός δειγμάτων
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>K.pneumoniae</i>	KPC	17
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>K.pneumoniae</i>	VIM	2
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>K.pneumoniae</i>	OXA-48	1
<i>bla</i> <sub>KPC</sub> / <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>K.pneumoniae</i> + μη Εντεροβακτηριακό	KPC (ανακαλλιεργήθηκε η <i>K.pneumoniae</i> )	1
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>K.pneumoniae</i> + μη Εντεροβακτηριακό	KPC (ανακαλλιεργήθηκε η <i>K.pneumoniae</i> )	1
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>K.pneumoniae</i> + <i>Pseudomonas</i> spp	VIM (ανακαλλιεργήθηκε η <i>K.pneumoniae</i> )	1
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>Pseudomonas</i> spp	VIM (ανακαλλιεργήθηκε η <i>Pseudomonas</i> )	4
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Καμία ανάπτυξη	-	2
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Καμία ανάπτυξη	-	1
<b>Σύνολο</b>			<b>30</b>

Από τους 30 ασθενείς οι οποίοι είχαν θετική direct PCR, οι 23 ανέπτυξαν Εντεροβακτηριακό με μηχανισμό παραγωγής καρβαπενεμάσης (CPE) στο τρυβλίο. Από τα υπόλοιπα 7 δείγματα, στα 4 αναπτύχθηκε *Pseudomonas* spp που παράγαγε MβL-VIM και στα 3 δεν αναπτύχθηκε κανένα μικρόβιο, παρ'όλο που ανιχνεύθηκαν *bla*<sub>VIM</sub> και *bla*<sub>KPC</sub> μέσω PCR. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν ασυμφωνία. Σε δύο δείγματα αναπτύχθηκαν δύο μικρόβια, το ένα εκ των οποίων ήταν *K.pneumoniae* που παράγαγε KPC και το δεύτερο μη Εντεροβακτηριακό που δεν ταυτοποιήθηκε περαιτέρω. Επιπλέον σε ένα δείγμα αναπτύχθηκαν αποικίες *K.pneumoniae* που παράγαγε VIM και αποικίες *Pseudomonas* spp χωρίς μηχανισμό παραγωγής καρβαπενεμασών.



Συμπερασματικά, οι θετικοί στον έλεγχο με direct PCR ασθενείς, στους οποίους αναπτύχθηκε ταυτόχρονα CPE στο τρυβλίο ανέρχονται στους 23/576 (3.9%) (σύνολο ελεγχθέντων με PCR). Φαίνεται έτσι ότι οι κλασσικές φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν υπεροχή στην ταυτοποίηση του μικροβίου που παράγει καρβαπενεμάση, καθώς σε πέντε (5) ασθενείς, τα γονίδια *bla<sub>VIM</sub>* που ταυτοποιήθηκαν μέσω PCR ανήκαν σε μη Εντεροβακτηριακά. Από τους 576 ασθενείς που ελέγχθηκαν και με τις δύο μεθόδους ταυτόχρονα, όπως προαναφέρθηκε, παρατηρήθηκε ασυμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων σε **επτά (7)** ασθενείς, οι οποίοι είχαν θετική μεν PCR, ωστόσο χωρίς ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο: σε τέσσερις (4) αναπτύχθηκε *Pseudomonas* spp και στους τρεις (3) δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη μικροβίου.

Αντίστροφα, σε κάποιους ασθενείς υπήρξε ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο, χωρίς όμως να υπάρξει ταυτόχρονα θετική direct PCR. Τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων αυτών παρουσιάζονται στον **πίνακα 15**.

**Πίνακας 15:** Χαρακτηριστικά θετικών με φαινοτυπική ανίχνευση δειγμάτων, με ταυτόχρονη αρνητική PCR απευθείας στο ορθικό δείγμα (direct PCR)

Αποτέλεσμα καλλιέργειας	Αποτέλεσμα φαινοτυπικών τεστ & μοριακής ταυτοποίησης στο ανακαλλιέργημα	Direct PCR	Αριθμός δειγμάτων
<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	<b>1</b>
<i>K.pneumoniae</i>	KPC	-	<b>2</b>
<i>Pseudomonas</i> spp	-	-	<b>18</b>
Άλλο μη Εντεροβακτηριακό	-	-	<b>5</b>
Καμία ανάπτυξη	-	-	<b>520</b>
<b>Σύνολο</b>			<b>546</b>

Συμπερασματικά σε τρία (3) δείγματα τα οποία εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους υπήρξε ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο και ταυτοποίηση καρβαπενεμάσης (2 KPC και 1 NDM), χωρίς όπως να υπάρχει αντίστοιχη ανίχνευση γονιδίου στην direct PCR. Σε 23 ασθενείς

υπήρξε ανάπτυξη μη Εντεροβακτηριακών στο τρυβλίο χωρίς μηχανισμό παραγωγής καρβαπενεμάσης. Τέλος, σε 520/576 (90.2%) ασθενείς δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο και ταυτόχρονα η PCR απευθείας στο δείγμα ήταν επίσης αρνητική. Στον **πίνακα 16** γίνεται σύνοψη των ευρημάτων.

**Πίνακας 16:** Σύνοψη των ευρημάτων. (EDTA + BA= Αποτέλεσμα στις δοκιμασίες με EDTA και βορονικό οξύ). Δείγματα στα ποία πραγματοποιήθηκαν φαινοτυπικές μέθοδοι και direct PCR.

<b>Enriched McConkey</b>	<b>EDTA ή BA θετικά</b>	<b>Αποτέλεσμα direct PCR</b>
Εντεροβακτηριακά με μηχανισμό παραγωγής καρβαπενεμάσης (CPE): <b>22</b>	KPC: <b>19</b> MBL: <b>2</b> Απροσδιόριστο: <b>1</b>	Θετική: <b>19</b> (17 KPC, 1 OXA-48, 1 VIM) Αρνητική: <b>3</b>
Εντεροβακτηριακά με μηχανισμό (CPE) + άλλο μικρόβιο χωρίς μηχανισμό: <b>4</b>	KPC: <b>3</b> MBL: <b>1</b>	Θετική: <b>4</b> (KPC: 2, VIM:1, KPC+VIM: 1) Αρνητική: <b>0</b>
Άλλο μη Εντεροβακτηριακό + <i>Pseudomonas</i> : <b>1</b>	MBL	Θετική (VIM)
Μη εντεροβακτηριακά: <b>26</b>	MBL: <b>3</b>	Θετική: <b>3</b> (VIM) Αρνητική: <b>23</b>
Καμία ανάπτυξη: <b>523</b>	(-)	Θετική: <b>3</b> (VIM:2, KPC:1) Αρνητική: <b>520</b>
<b>Σύνολο: 576</b>	<b>30</b>	<b>Θετική: 30</b> <b>Αρνητική: 546</b>

### 3.3.2. Συγκριτική ανάλυση

Η συγκριτική ανάλυση των δύο μεθόδων απαιτεί τον καθορισμό μιας μεθοδολογίας εκλογής, η οποία θα αποτελέσει τη βάση της σύγκρισης. Για τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, η δοκιμασία εκλογής ορίστηκε ως η ανίχνευση CPE με τις κλασσικές φαινοτυπικές μεθόδους και η εκ των υστέρων μοριακή επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Έτσι έγιναν οι ακόλουθες παραδοχές:

- Αληθώς θετικοί: Θετική direct PCR + ταύτιση αποτελέσματος με μοριακά επιβεβαιωμένο αποτέλεσμα καλλιέργειας (Σύνολο: **23**)
- Αληθώς αρνητικοί: Αρνητική direct PCR + χωρίς ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο (520 καμία ανάπτυξη, 18 *Pseudomonas* spp, 5 άλλο μη Εντεροβακτηριακό, Σύνολο: **543**)
- Ψευδώς θετικοί: Θετική direct PCR που δεν αντιστοιχεί σε CPE στο τρυβλίο ή που δεν παρουσιάζει καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο (4 *Pseudomonas* spp, 3 καμία ανάπτυξη, Σύνολο: **7**)
- Ψευδώς αρνητικοί: Αρνητική direct PCR με ταυτόχρονη ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο με μοριακή επαλήθευση (Σύνολο: **3**)

Στον **πίνακα 17** γίνεται διαζονική κατάταξη των αποτελεσμάτων της direct PCR σε σχέση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκλογής (φαινοτυπικές δοκιμασίες με μοριακή επιβεβαίωση) και στον **πίνακα 18** απεικονίζεται η επίδοση της δοκιμασίας και η θετική και αρνητική προγνωστική της αξία.

**Πίνακας 17:** Διαξονική κατάταξη των αποτελεσμάτων της direct PCR (θετική ή αρνητική) σε σχέση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας εκλογής (φαινοτυπική δοκιμασία και μοριακή επιβεβαίωση)

		Enriched McConkey		Σύνολο
		+	-	
Direct PCR	+	23	7	<b>30</b>
	-	3	543	<b>546</b>
Σύνολο		<b>26</b>	<b>550</b>	<b>576</b>

**Πίνακας 18:** Επίδοση της direct PCR για την ανίχνευση καρβαπενεμασών σε ορθικά δείγματα, σε σχέση με διαγνωστική μέθοδο μέσω καλλιέργειας και προσδιορισμό φαινοτύπου (PPV: θετική προγνωστική αξία, NPV: αρνητική προγνωστική αξία)

	Σύγκριση PCR και καλλιέργειας				Επίδοση δοκιμασίας (direct PCR)		Προγνωστική αξία	
	Αληθώς θετικά (n)	Αληθώς αρνητικά (n)	Ψευδώς θετικά (n)	Ψευδώς αρνητικά (n)	Ευαισθησία	Ειδικότητα	PPV	NPV
Ορθικά δείγματα	23	543	7	3	88.4%	98.7%	76.6%	99.5%

#### 3.4. Προσδιορισμός του ποσοστού των αποικισμένων ασθενών που εξελίσσονται σε CPE βακτηριαμιά

Από τους ασθενείς που βρέθηκαν αποικισμένοι από CPE (n=98) στον πληθυσμό προέλευσης, οι 11 ανέπτυξαν στη συνέχεια βακτηριαμιά από το στέλεχος αποικισμού (11/98, 11.2%), ενώ από του αποικισμένους στον πληθυσμό επικύρωσης (n=87), οι 14 ανέπτυξαν βακτηριαμιά από το ίδιο στέλεχος (14/87, 16.1%). Τα στοιχεία αυτά και η κατανομή των ασθενών στις κλινικές παρουσιάζονται στους **πίνακες 8, 9 και 10**.

## 4. Συζήτηση

Κριτικής σημασίας στην επιτυχία της διακοπής της μετάδοσης των CPE σε μία μονάδα υγείας είναι η έγκαιρη ταυτοποίηση των αποικισμένων και/ή των ασθενών με λοίμωξη. Κατά συνέπεια κάθε κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο θα πρέπει να διασφαλίσει μία αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης. Το βασικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι ποιοί ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται για αποικισμό σε ένα περιβάλλον με περιορισμένους πόρους και υψηλή ενδημικότητα, όπως τα ελληνικά νοσοκομεία. Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, η πιθανότητα de novo εισαγωγής CPE σε μία προηγουμένως ελεύθερη από CPE μονάδα είναι υψηλή (Miriagou et al., 2010). Με αυτά τα δεδομένα, η αξιολόγηση των ασθενών βάσει παραγόντων κινδύνου για αποικισμό, άμα τη αφίξει τους στο νοσοκομείο καθίσταται εκ των ων ουκ άνευ. Τα τελευταία χρόνια λόγω της αθρόας διασποράς των CPE στις μονάδες υγείας παγκοσμίως, πολλές μελέτες έχουν ως στόχο την παραγωγή κλιμάκων κινδύνου, με βάση τις οποίες μπορεί ευκολότερα να αξιολογηθεί η πιθανότητα αποικισμού ενός ασθενούς κατά την εισαγωγή του στο νοσοκομείο (Burillo et al., 2019). Απώτερος στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η απομόνωση ενός πιθανά αποικισμένου ασθενούς έως ότου είναι διαθέσιμο το αποτέλεσμα της καλλιέργειας για να προληφθεί η ενδονοσοκομειακή διασπορά του πολυανθεκτικού μικροβίου, και ακόμα περισσότερο η πρόληψη της λοίμωξης (G. L. Daikos et al., 2010). Έως σήμερα δεν έχει θεσπιστεί η χρήση μίας καθολικά αποδεκτής κλίμακας αξιολόγησης του κινδύνου αποικισμού ενός ασθενούς κατά την εισαγωγή του στο νοσοκομείο σε μία ενδημική περιοχή.

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης προκύπτουν οι επτά προαναφερθέντες στατιστικά σημαντικοί παράγοντες κινδύνου: η κλίμακα Karnofsky, το ιστορικό προηγούμενης νοσηλείας, η διαμονή σε μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας ή σε γηροκομείο, ο γνωστός αποικισμός ή λοίμωξη από CPE στο παρελθόν, το ιστορικό διενέργειας  $\geq 2$  διαφορετικών παρεμβατικών διαδικασιών κατά την προηγούμενη νοσηλεία, η αιμοκάθαρση κατά το τελευταίο βμηνο και η συννοσηρότητα με διαβήτη με παρουσία βλάβης τελικού οργάνου-στόχου. Στους παράγοντες αυτούς αποδόθηκε σταθμισμένη βαθμολόγηση και δημιουργήθηκε μία κλίμακα πρόβλεψης κινδύνου αποικισμού (risk score), η οποία θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στα χέρια του κλινικού ιατρού στη λήψη αποφάσεων διαχείρισης των ασθενών κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο. Απώτερο στόχο αποτελεί η εφαρμογή της κλίμακας κινδύνου σε διαφορετικό πληθυσμό και η αξιολόγηση της απόδοσής της.

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε ένα τριτοβάθμιο νοσοκομείο της Αθήνας, όπου οι σοβαρές λοιμώξεις από CPE αυξάνονται όλο και περισσότερο σε συχνότητα (Polemis, Tryfinopoulou, Giakkouri, group, & Vatoroulos, 2020). Δεδομένου ότι ο καθολικός έλεγχος αποικισμού δεν είναι πάντα εφικτός, οι στρατηγικές ελέγχου εξαρτώνται από το περιβάλλον αναφοράς. Σε κλινικές υψηλού κινδύνου και υψηλής επίπτωσης πολυανθεκτικών μικροβίων όπως οι ΜΕΘ, η αιματολογική και οι μονάδες μεταμοσχεύσεων, όπου ο αποικισμός από CPE θα μπορούσε να είναι καταστροφικός τόσο για τον αποικισμένο ασθενή, όσο και για τους ασθενείς σε γειτνίαση, η καθολική επιτήρηση αποικισμών αποτελεί την βέλτιστη στρατηγική (Spyridopoulou et al., 2020). Αντιθέτως σε κλινικές χαμηλού κινδύνου σε ενδημικές περιοχές, η χρήση εργαλείων διαστρωμάτωσης κινδύνου επιτρέπει την κατάταξη των ασθενών αναλόγως της πιθανότητας φορείας CPE. Τα ευρήματα της παρούσας έρευνας αποδεικνύουν ότι οι ασθενείς-φορείς CPE μπορούν να εντοπιστούν αξιόπιστα κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο μέσω μίας κλινικής προγνωστικής κλίμακας, κατασκευασμένης από μεταβλητές οι οποίες είναι εύκολα διαθέσιμες τη στιγμή της εισαγωγής. Η κλίμακα που δημιουργήθηκε μπόρεσε να καθοδηγήσει με επιτυχία το στοχευμένο έλεγχο αποικισμού και σημαντικότερα, την εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων και την έγκαιρη έναρξη κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Η κατασκευή του μοντέλου στον πληθυσμό προέλευσης και η επικύρωσή του σε μία άλλη χρονική περίοδο αυξάνουν την πιθανότητα τα ευρήματα να μπορούν να γενικευθούν. Η κλίμακα επέδειξε ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα (discrimination) όπως και βαθμονόμηση (calibration) τόσο στον πληθυσμό προέλευσης (derivation), όσο και στον πληθυσμό επικύρωσης (validation). Κατ' αυτόν τον τρόπο το παρόν μοντέλο μπόρεσε να διαχωρίσει αποτελεσματικά τους ασθενείς ανάλογα με τον κίνδυνο αποικισμού, βάσει επτά διακριτών προγνωστικών παραγόντων. Κάποιοι από τους προγνωστικούς παράγοντες αντανάκλυσαν την επαφή με το σύστημα υγείας ή τη διαμονή σε κέντρα αποκατάστασης και την τοπική επιδημιολογία, ενώ άλλοι αποτύπωναν την ευαισθησία των ασθενών για αποικισμό εξ' αιτίας υποκείμενων παθήσεων ή προηγούμενης έκθεσης σε αντιβιοτικά. Ο σκός 27 της κλίμακας κινδύνου μεγιστοποίησε την ευαισθησία και την ειδικότητα στον πληθυσμό προέλευσης (72% και 81% αντίστοιχα). Ωστόσο η απόφαση του ορίου που θα χρησιμοποιηθεί κατά την εφαρμογή της κλίμακας έγκειται στις δυνατότητες της εκάστοτε κλινικής. Η επιλογή ενός σκός με μεγαλύτερη ευαισθησία θα μείωνε τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών δειγμάτων αλλά θα επιβάρυνε αριθμητικά το σύστημα όσον αφορά στο πλήθος των ασθενών που θα πρέπει να ελεγχθούν για αποικισμό.

Αρκετές έρευνες στο παρελθόν έχουν δημιουργήσει κλινικά προγνωστικά εργαλεία για την αντοχή στα Gram αρνητικά μικρόβια (T. Sullivan et al., 2018; Tseng et al., 2017; M. Tumbarello et al., 2014; D. Yang, Xie, Xin, Xue, & Zhang, 2016). Οι Tumbarello και συν. κατασκεύασαν μία κλίμακα για την αναγνώριση ασθενών-φορέων Εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο (M. Tumbarello et al., 2011). Οι Teysseyve και συν. δημιούργησαν και επικύρωσαν μία κλίμακα πρόγνωσης παρουσίας βακτηρίων που χρειάζονται θεραπεία με καρβαπενέμες, γνωστή ως carbaSCORE (Teyseyve et al., 2019). Η έρευνα των Lin και συν. ανέπτυξε ένα προγνωστικό μοντέλο αποικισμού με CPE κατά την εισαγωγή ασθενών με χρήση πληροφοριών από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων του νοσοκομείου, εξαιρώντας εντελώς τη χρήση ανθρώπινου δυναμικού (Lin et al., 2019). Ένας βασικός περιορισμός της έρευνας αυτής ήταν ότι το μοντέλο βαθμονομήθηκε σε ασθενείς οι οποίοι είχαν καταγραφεί στο σύστημα ως αποικισμένοι με CRE, χωρίς να συμπεριλαμβάνει τους αδιάγνωστους ασυμπτωματικούς φορείς.

Η παρούσα μελέτη βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες (van Loon, Voor In 't Holt, & Vos, 2018), οι οποίες αναδεικνύουν ως παράγοντα κινδύνου για αποικισμό με CPE τη διενέργεια παρεμβάσεων (interventions) ενδονοδοκομειακά ή σε εξωτερική βάση. Συγκεκριμένα ασθενείς οι οποίοι είχαν υποστεί  $\geq 2$  παρεμβάσεις κατά το προηγούμενο 6μηνο είχαν 1.84 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι φορείς CPE. Επιπλέον ασθενείς υπό αιμοκάθαρση κατά την ίδια περίοδο εμφάνιζαν 2.84 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο. Άλλος σημαντικός παράγοντας κινδύνου, ο οποίος έχει συσχετισθεί με αποικισμό με CPE στη βιβλιογραφία είναι η συννοσηρότητα των ασθενών (Kofteridis et al., 2014; Song & Jeong, 2018; Swaminathan et al., 2013; van Loon et al., 2018). Η συσχέτιση αυτή αναπαρήχθη και στην παρούσα μελέτη: η παρουσία διαβήτη με βλάβη οργάνου-στόχου συσχετίστηκε με 3.1 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ένας ασθενής να φέρει CPE. Σε συμφωνία επίσης με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (M. E. Falagas et al., 2007; Lin et al., 2013; M. Papadimitriou-Olivgeris et al., 2012; Segagni Lusignani, Presterl, Zatorska, Van den Nest, & Diab-Elschahawi, 2020; Simner et al., 2018) ήταν και η ανάδειξη της προηγούμενης νοσηλείας, τόσο της βραχυπρόθεσμης (<10 μέρες) όσο και της μακροπρόθεσμης (>10 μέρες) αλλά και της διαμονής σε κέντρο αποκατάστασης ως ανεξάρτητων παραγόντων κινδύνου αποικισμού με CPE (OR = 3.11, 95% CI: 1.32-7.35, OR = 7.40, 95% CI: 3.57-15.34, OR = 3.32, 95% CI: 1.44-7.65, αντίστοιχα).

Το ιστορικό αποικισμού ή λοίμωξης με CPE κατά το προηγούμενο 6μηνο βρέθηκε επίσης να είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου αποικισμού με CPE κατά τη νέα εισαγωγή,

με διπλάσιο σχετικό κίνδυνο (OR = 6.08, 95% CI: 3.17-11.64). Προηγούμενες έρευνες έχουν προσδιορίσει το ιστορικό αποικισμού με CPKp ως προγνωστικό δείκτη λοίμωξης από *Klebsiella pneumoniae* σε ασθενείς σε ΜΕΘ (Y. Li et al., 2019) και βακτηριαμίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς (T. Sullivan et al., 2018). Επιπλέον ο προηγούμενος αποικισμός με CRE έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας κινδύνου αποικισμού από CRE κατά τη νέα εισαγωγή (Burillo et al., 2019).

Η κλίμακα αξιολόγησης λειτουργικής κατάστασης Karnofsky διαχωρίζει τους ασθενείς ανάλογα με τη λειτουργικότητά τους. Στην παρούσα μελέτη, μία αύξηση του σκορ λειτουργικότητας κατά δέκα μονάδες σχετίστηκε με μία μικρή μείωση του κινδύνου του ασθενούς (ανά 10 μονάδες, OR = 0.99, 95% CI: 0.98-0.9996). Η λειτουργική έκπτωση των ασθενών έχει συσχετισθεί στη βιβλιογραφία με μεγαλύτερο κίνδυνο αποικισμού και λοίμωξης από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς (multidrug-resistant organisms, MDROs) (Anderson et al., 2008; Rao et al., 2013; Rodriguez-Villodres et al., 2021). Οι Asai και συν. ερεύνησαν τη συσχέτιση της λειτουργικής κατάστασης και του κινδύνου αποικισμού με CRE χρησιμοποιώντας την κλίμακα Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) (Asai et al., 2018). Ο συνδυασμός της λειτουργικής έκπτωσης (PS 2-4) και συννοσηρότητας (CCI  $\geq$ 3) αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για αποικισμό με CRE. Στην έρευνα των Martin και συν., στην οποία δημιουργήθηκε ένα σκορ διαχωρισμού της μικροβιαμίας από CRE έναντι ESBL, η «εξαρτημένη» λειτουργική κατάσταση στην εισαγωγή, μεταξύ άλλων παραγόντων, προσδιορίστηκε ως προγνωστικός παράγον για λοίμωξη από CRE (Martin et al., 2013).

Υπάρχει αποδεδειγμένη σχέση μεταξύ αποικισμού από CRE και λοίμωξης από το ίδιο στέλεχος, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν ως και διπλάσιο κίνδυνο σε σχέση με μη-αποικισμένους (McConville, Sullivan, Gomez-Simmonds, Whittier, & Uhlemann, 2017). Από διάφορες αναδρομικές, ασθενών-μαρτύρων και προοπτικές μελέτες, τα ποσοστά οποιασδήποτε λοίμωξης από CRE σε ασθενείς αποικισμένους από το στέλεχος που προκάλεσε τη λοίμωξη κυμαίνονται από 7.6-44.4%. Σύμφωνα με ανασκόπηση, τα ποσοτικά δεδομένα όσον αφορά την εντόπιση της λοίμωξης αναδεικνύουν την πνευμονία ως συχνότερη (50% των αποικισμένων ασθενών που ανέπτυξαν λοίμωξη), λοιμώξεις του ουροποιητικού (20%), βακτηριαμία (13.5%) και λοιμώξεις μαλακών μορίων (7.2%) (Tischendorf et al., 2016). Παράγοντες που βρέθηκαν να σχετίζονται με την εξέλιξη του αποικισμού σε μικροβιαμία ήταν το περιβάλλον νοσηλείας του ασθενή, το ιστορικό, η πρωτοπαθής νόσος και η συννοσηρότητα, η χώρα νοσηλείας, το μικρόβιο αποικισμού, αλλά



και η καρβαπενεμάση που παράγεται, με τους αποικισμένους από NDM να εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο (Marco Falcone et al., 2022; Tischendorf et al., 2016; Wangchinda, Laohasakpravit, Lerdlamyong, & Thamlikitkul, 2022). Η συχνότητα της εμφάνισης μικροβιαμίας στους αποικισμένους ασθενείς ποικίλει. Σε ασθενείς σε ΜΕΘ στο Ισραήλ και τις ΗΠΑ, το ποσοστό κυμάνθηκε μεταξύ 5.5-8% (Debby et al., 2012; McConville et al., 2017), ενώ σε ασθενείς-λήπτες ηπατικού μοσχεύματος η εξέλιξη του αποικισμού σε βακτηριαμία ανήλθε στο 56% των αποικισμένων (Lübbert et al., 2014). Σε ουδετεροπενικούς, αποικισμένους με CRE ασθενείς στην Ινδία το 18% εξελίχθηκε σε μικροβιαμία, με θνητότητα του ύψους 100% (Jaiswal et al., 2018), ενώ σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα σε αιματολογικούς και ασθενείς σε ΜΕΘ μόλις το 2.4% των αποικισμένων παρουσίασε στη συνέχεια μικροβιαμία (Wang et al., 2021). Ταυτόχρονα, σε άλλη έρευνα από την Κίνα το 15% αποικισμένων ασθενών εξελίχθηκε σε μικροβιαμία (W. Chu et al., 2022), ενώ σε πρόσφατη έρευνα στην Ιταλία, το 11.8% των αποικισμένων ανέπτυξαν μικροβιαμία από τον ίδιο παράγοντα (Marco Falcone et al., 2022). Κατά τα έτη 2013-2015, κατά τη διάρκεια ολιγοκλωνικής επιδημίας από CRKp σε ΜΕΘ νοσοκομείου στη χώρα μας, το ποσοστό των βακτηριαμικών ασθενών έφτασε το 68% επί των αποικισμένων, με θνητότητα που ανήλθε στο 48% (Protonotariou et al., 2018). Σε παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες ή λήπτες μοσχεύματος μυελού των οστών, η βακτηριαμία στους αποικισμένους έφτασε το 26% (Giannini et al., 2017). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Borer et al., 2012; Tischendorf et al., 2016), το ποσοστό των αποικισμένων ασθενών της παρούσας έρευνας που ανέπτυξαν βακτηριαμία από το στέλεχος αποικισμού ανήλθε σε 11% στον πληθυσμό προέλευσης και 16% στον πληθυσμό επικύρωσης, με ποικιλία στη συχνότητα μεταξύ των συμμετεχουσών κλινικών.

Η αδρή θνητότητα διάφορων λοιμώξεων από CRE κυμαίνεται μεταξύ 30-44% (Borer et al., 2009; M. E. Falagas et al., 2007). Η θνητότητα διεισδυτικών λοιμώξεων από CRE, συμπεριλαμβανομένης και της βακτηριαμίας ανέρχεται στο δυσθεώρητο ποσοστό του 75% (Borer et al., 2012; Borer et al., 2009; Tischendorf et al., 2016). Γίνεται έτσι αντιληπτό πόσο σημαντική είναι η ενεργή επιτήρηση αποικισμών για την εφαρμογή κατάλληλης εμπειρικής αντιμικροβιακής θεραπείας και πρόληψης περαιτέρω διασποράς ανθεκτικών στελεχών.

Τα ευρήματα της έρευνας θα πρέπει να ερμηνευτούν λαμβάνοντας υπόψιν ορισμένους περιορισμούς. Η γνωστή συσχέτιση μεταξύ του ιστορικού έκθεσης σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Segagni Lusignani et al., 2020; Swaminathan et al., 2013; P. Yang et al., 2018) ιδιαιτέρως στις καρβαπενέμες (M. Papadimitriou-Olivgeris et al., 2012; van Loon et al., 2018) και της φορέας CPE δεν επιβεβαιώθηκε. Παρ' ότι η χρήση

αντιβιοτικής αγωγής κατά το τελευταίο 6μηνο σχετίστηκε με αποικισμό από CPE στη μονοπαραγοντική ανάλυση, δεν αναγνωρίστηκε ως σημαντικός παράγων στο πολυπαραγοντικό μοντέλο. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη διαφοροποίησης στην καταγραφή του ιστορικού των ασθενών αναλόγως του είδους του αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε, της διάρκειας της αγωγής και του χρονικού διαστήματος που πέρασε από τη λήψη της αγωγής. Είναι άξιο προσοχής το γεγονός ότι στην Ελλάδα την περίοδο διενέργειας της έρευνας η ιατρική συνταγή, ηλεκτρονική ή χειρόγραφη, δεν ήταν προαπαιτούμενο για τη λήψη αντιβίωσης. Κατά συνέπεια, οι πληροφορίες σχετικά με προηγούμενη έκθεση σε αντιμικροβιακή αγωγή βασίστηκαν κυρίως στη διεξοδική λήψη ιστορικού και την ακριβή ανάκληση από τους ασθενείς, τουλάχιστον αναφορικά με τους ασθενείς με προέλευση από την κοινότητα, χωρίς δηλαδή ιστορικό νοσηλείων. Πέραν αυτού, οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων των ελληνικών νοσοκομείων δεν περιλαμβάνουν πληροφορίες για το ιστορικό των ασθενών ή την προηγούμενη θεραπευτική αγωγή. Ακόμη, δεν υπάρχει διανοσοκομειακή επικοινωνία, γεγονός που καθιστά τη λήψη ιστορικού μεγάλη πρόκληση στην καθημερινότητα μίας κλινικής (Gupta, Limbago, Patel, & Kallen, 2011; Segagni Lusignani et al., 2020). Ωστόσο η συντριπτική πλειοψηφία όσων ασθενών είχαν προηγούμενες νοσηλείες, οι οποίοι αποτελούσαν σχεδόν τους μισούς από τους ασθενείς του πληθυσμού προέλευσης και επικύρωσης, έφεραν μαζί τους ενημερωτικά σημειώματα εξόδου από το νοσοκομείο, όπου καταγράφονταν προηγούμενες παρεμβάσεις, θεραπευτική αγωγή και άλλα κλινικά στοιχεία, ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα ανακριβούς καταγραφής στο ιστορικό.

Τα δεδομένα της έρευνας ελήφθησαν και επικυρώθηκαν σε ένα μονήρες κέντρο μίας ενδημικής για CPE γεωγραφικής περιοχής. Συνεπώς, τα ευρήματα μπορεί να μην είναι γενικεύσιμα σε άλλες περιοχές, με χαμηλότερο επιπολασμό CRE. Ωστόσο, οι παρόγοντες κινδύνου που προσδιορίστηκαν αναμένεται να είναι παρόμοιοι σε άλλες περιοχές υψηλής ενδημικότητας. Επιπλέον περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι ότι η επικύρωση διενεργήθηκε στο ίδιο νοσοκομείο αλλά σε άλλη χρονική περίοδο. Τέλος, άλλες μελέτες έχουν προσδιορίσει ως σημαντικό παράγοντα κινδύνου για αποικισμό με πολυανθεκτικά μικρόβια την επαφή με άλλο σύστημα υγείας, εκτός της χώρας. Δεδομένου όμως ότι η Ελλάδα αποτελεί ήδη μία περιοχή υψηλού επιπολασμού CRE, πολύ περιορισμένος αριθμός χωρών θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως έκθεση «υψηλού κινδύνου» για τους συμμετέχοντες ασθενείς.

Παρά την ύπαρξη των ανωτέρω περιορισμών, η παρούσα έρευνα έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Απ' όσο γνωρίζουμε, είναι η μεγαλύτερη μελέτη που αξιολογεί παράγοντες

κινδύνου αποικισμού με CPE κατά την εισαγωγή στο νοσοκομείο, και μία από τις πρώτες μελέτες που προσδιόρισε τους παράγοντες κινδύνου και δημιούργησε μία προγνωστική κλίμακα. Η χρήση της κλίμακας με κυμαινόμενο ουδό θα επιτρέψει τη χρήση του σκορ σε κλινικές υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύονται περαιτέρω από τον μεγάλο αριθμό και την ποικιλία παραγόντων κινδύνου οι οποίοι ελέγχθησαν, καθώς και την περιεκτική καταγραφή του ιστορικού των ασθενών, χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό face-to-face προσέγγισης και εμβριθούς εξέτασης του ιατρικού φακέλου των ασθενών. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στα πλεονεκτήματα της μελέτης συγκαταλέγεται και το γεγονός ότι έγινε χρήση και φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση στελεχών CRE που παρήγαγαν καρβαπενεμάσες.

Η περαιτέρω αύξηση στη μικροβιακή αντοχή που παρατηρείται στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19 (Polemis et al., 2021), καθώς και η παράδοξη αύξηση της επίπτωσης των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια παρά τα επιπρόσθετα μέτρα προστασίας και περιορισμού διασποράς (Bongiovanni, Barilaro, Zanini, & Giuliani, 2022; M. Falcone et al., 2022; Gomez-Simmonds et al., 2021; Medrzycka-Dabrowska et al., 2021), υπογραμμίζουν την ανάγκη χρήσης τέτοιου είδους εργαλείων κατά την εφαρμογή ελέγχου λοιμώξεων. Σε περίπτωση που ο επιπολασμός CPE στην Ελλάδα αυξηθεί περαιτέρω, η θετική προγνωστική αξία ανά ουδό της κλίμακας αναμένεται να είναι ακόμα υψηλότερη από αυτή στον πληθυσμό προέλευσης. Θα χρειαστούν περαιτέρω έρευνες στο μέλλον για να αξιολογήσουν τη διακριτική ικανότητα και τη βαθμονόμηση της κλίμακας σε ασθενείς που νοσηλεύτηκαν μετά την έναρξη της πανδημίας, το 2020.

Εν κατακλείδι, το προγνωστικό αυτό εργαλείο είναι η πρώτη κλίμακα που ελέγχει τόσο μεγάλο αριθμό πιθανών παραγόντων κινδύνου και μπορεί να εξυπηρετήσει τους ιατρούς πρώτης γραμμής μίας ενδημικής περιοχής στην έγκαιρη αναγνώριση των ασθενών, που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να φέρουν CPE κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο. Η σωστή χρήση αυτού του εργαλείου θα ελαχιστοποιήσει το χρόνο που χρειάζεται για την αναγνώριση των ασθενών-φορέων και θα επιτρέψει την ταχεία εφαρμογή μέτρων που στοχεύουν στον περιορισμό της ενδονοσοκομειακής διασποράς ανθεκτικών μικροοργανισμών.

Όσον αφορά στο δευτερεύοντα στόχο της μελέτης, τη σύγκριση δηλαδή μεταξύ φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων ανίχνευσης φορείας CPE, η επίδοση της direct PCR στο ορθικό δείγμα ήταν αντίστοιχη με αυτή σε άλλες έρευνες (ευαισθησία 88.4% και ειδικότητα 98.7%) (T.-D. Huang et al., 2015; Lau et al., 2015; S. N. Richter et al., 2012).

Παρ' όλο που οι μελέτες σύγκρισης μεταξύ των δύο μεθόδων σπανίζουν, σε πρόσφατη μετα-ανάλυση η ευαισθησία και η ειδικότητα εφαρμογών PCR απευθείας σε ορθικά δείγματα για ανίχνευση CPE ήταν πολύ καλή (ως 95%) και άριστη (ως 99%) αντίστοιχα (Antonelli et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη υπήρξε ασυμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων σε 10 δείγματα. Σε 4 περιπτώσεις η ανίχνευση VIM με PCR αντίστοιχούσε σε *Pseudomonas* και όχι *Enterobacterales*, σε 3 περιπτώσεις δεν υπήρξε καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο, ενώ σε 3 περιπτώσεις υπήρξε ανάπτυξη CPE στο τρυβλίο, χωρίς όμως ανίχνευση καρβαπενεμάσης με PCR. Οι περιπτώσεις που δεν υπήρξε ανάπτυξη στο τρυβλίο, θα μπορούσαν να οφείλονται σε μείωση του βακτηριακού φορτίου λόγω κατανάλωσης αντιβιοτικών, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία των καλλιιεργειών. Ωστόσο είναι χαρακτηριστικό ότι μία θετική PCR δεν αποδεικνύει την παρουσία ζώντων βακτηρίων.

Σε καταστάσεις συρροής κρουσμάτων με βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες θα είχε νοήμα να γίνεται έλεγχος τόσο των ασθενών, όσο και του προσωπικού και του άψυχου περιβάλλοντος ώστε να προσδιοριστεί το μέγεθος και η αιτία της επιδημίας (Dancer, 2014). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ταχύτητα και η ακρίβεια του αποτελέσματος έχουν σημασία ώστε να εφαρμοστούν μέτρα ελέγχου διασποράς. Προτείνεται λοιπόν η χρήση και των δύο μεθόδων με στόχο να υπάρχει ένα πρώτο γρήγορο αποτέλεσμα όσον αφορά την ύπαρξη καρβαπενεμάσης και στη συνέχεια να γίνεται προσδιορισμός του στελέχους (Probst et al., 2022). Πέραν αυτής της περίπτωσης, η χρήση της direct PCR θα είχε αξία σε ασθενείς με γνωστό αποικισμό από CPE για παρακολούθηση της κατάστασης αποικισμού σε βάθος χρόνου και λήψη κατάλληλων κλινικών αποφάσεων.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό συμφωνίας. Η ανίχνευση CPE μέσω φαινοτυπικών μεθόδων φαίνεται ότι υπερτερεί των μοριακών στη δυνατότητα προσδιορισμού του μικροβίου που παράγει καρβαπενεμάση, δεδομένου ότι η PCR ανιχνεύει αποκλειστικά και μόνο το γονίδιο που φέρει ένα άγνωστο μικρόβιο. Δεδομένης της ευρείας διασποράς των μεταλλο-β-λακταμασών, κυρίως VIM, σε μικρόβια όπως η *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*, γίνεται σαφής η ανάγκη προσδιορισμού του μικροβίου που φέρει την κάθε καρβαπενεμάση. Επιπλέον η ταυτοποίηση CPE μέσω φαινοτυπικών μεθόδων συνεχίζει να αποτελεί μία οικονομική επιλογή, εν συγκρίσει με την εφαρμογή multiplex PCR. Βασικό μειονέκτημά της έναντι των μοριακών τεχνικών είναι ο χρόνος διάγνωσης. Ενώ με τη χρήση των μοριακών τεχνικών ο κλινικός ιατρός ενισχύεται με μία γρήγορη απάντηση, την οποία ακολουθεί απομόνωση του ασθενούς-φορέα, η χρήση των φαινοτυπικών μεθόδων μπορεί να καθυστερήσει την ταυτοποίηση έως και 72 ώρες, κρίσιμες για τη διασπορά του μικροβίου εντός του

νοσοκομειακού περιβάλλοντος (T. D. Huang et al., 2015). Συνεπώς προτείνεται η χρήση της μεθόδου direct PCR σε περιπτώσεις συρροής κρουσμάτων, καθώς και σε ασθενείς με γνωστό αποικισμό για παρακολούθηση της κατάστασης φορέας.

## Περίληψη

**Σκοπός:** Τα Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες (CPE) αποτελούν σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι ασυμπτωματικοί αποικισμένοι ασθενείς είναι η πηγή της περαιτέρω διασποράς στις μονάδες υγείας. Δεδομένου ότι η έγκαιρη ανίχνευση των φορέων CPE είναι εξαιρετικής σημασίας αλλά η καθολική εφαρμογή ελέγχου αποικισμών δεν είναι πραγματοποιήσιμη, στοχεύσαμε στην ανάπτυξη και την επικύρωση μίας κλίμακας κινδύνου για την ανίχνευση των ασθενών-φορέων CPE κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο.

**Μεθοδολογία:** Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε ένα τριτοβάθμιο νοσοκομείο με δύναμη 500 κλινών στην Αθήνα, η οποία είναι ενδημική για CPE περιοχή. Ελήφθησαν ορθικά δείγματα αποικισμού από 2303 ασθενείς σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την εισαγωγή τους. Τα Εντεροβακτηριακά που απομονώθηκαν μέσω καλλιιεργειών εξετάστηκαν για την παρουσία *bla<sub>NTM</sub>*, KPC, NDM, OXA-48 μέσω PCR και καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία και το ιστορικό των ασθενών για το προηγούμενο εξάμηνο. Οι παράγοντες κινδύνου για φορεία CPE προσδιορίστηκαν με χρήση μοντέλων πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης και δημιουργήθηκε μία κλίμακα κινδύνου. Η διαχωριστική ικανότητα της κλίμακας αξιολογήθηκε μέσω της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη ROC (AUROC) και η προγνωστική της απόδοση επικυρώθηκε σε ένα δεύτερο πληθυσμό 1391 ασθενών, σε μία διαφορετική χρονική περίοδο.

**Αποτελέσματα:** Προσδιορίστηκαν επτά παράγοντες κινδύνου: ο προηγούμενος αποικισμός ή λοίμωξη από CPE, η προηγούμενη νοσηλεία η διαμονή σε ίδρυμα μακροχρόνιας φροντίδας υγείας το ιστορικό διανέργειας  $\geq 2$  παρεμβατικών διαδικασιών, το ιστορικό αιμοκάθαρσης, ο διαβήτης με βλάβη οργάνου-στόχου και η βαθμολογία στην κλίμακα Karnofsky. Η κλίμακα που αναπτύχθηκε είχε εύρος 0 έως 79 βαθμούς. Η AUC στον πληθυσμό προέλευσης ήταν 0.84 και στον πληθυσμό επικύρωσης 0.85.

**Συμπεράσματα:** Το συγκεκριμένο προγνωστικό εργαλείο μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση ασθενών που φέρουν CPE κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο σε μία ενδημική περιοχή και μπορεί να καθοδηγήσει την έγκαιρη εφαρμογή κατάλληλων μέτρων θεραπείας και ελέγχου της διασποράς λοιμώξεων.

## Summary

**Objectives:** Carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) comprise important nosocomial pathogens worldwide. Colonized patients are the source of further dissemination in healthcare settings. Considering that timely detection of CPE carriers is pivotal but universal screening is unfeasible, we aimed to develop and validate a prediction score to detect patients harbouring CPE on hospital admission.

**Methods:** The study was conducted in a tertiary care hospital located in a CPE endemic area. Rectal swabs were obtained from 2303 patients, screened shortly after hospital admission. The Enterobacterales isolated in cultures were examined for the presence of blaVIM, KPC, NDM, OXA-48 by PCR. Demographic data and patient history of the previous 6 months were recorded. Risk factors for CPE carriage were identified using a multivariable logistic regression model and a points-system risk score was developed. The discriminative ability of the risk score was assessed using the AUC and its predictive performance was validated in a second dataset of 1391 patients in a different time period.

**Results:** Seven predictors were identified: previous CPE colonization or infection, prior hospitalization, stay in a long-term health care facility, history of  $\geq 2$  interventions, renal replacement therapy, diabetes with end-organ damage and Karnofsky score. The developed risk score in the derivation dataset ranged between 0 and 79 points, with an AUC of 0.84 in the derivation and 0.85 in the validation dataset.

**Conclusions:** This prediction tool may assist in identifying patients who are at risk of harbouring CPE on hospital admission in an endemic area and may guide clinicians to implement prompt and appropriate infection control measures.

## 5. Βιβλιογραφία

1. **Abdallah, H. M., Reuland, E. A., Wintermans, B. B., Al Naiemi, N., Koek, A., Abdelwahab, A. M., . . . Vandembroucke-Grauls, C. M.** (2015). Extended-Spectrum beta-Lactamases and/or Carbapenemases-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Chicken Meat in Zagazig, Egypt. *PLoS One*, *10*(8), e0136052. doi:10.1371/journal.pone.0136052
2. **Agwuh, K. N., & MacGowan, A.** (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *58*(2), 256-265.
3. **Akova, M., Daikos, G. L., Tzouvelekis, L., & Carmeli, Y.** (2012). Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*, *18*(5), 439-448. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03823.x
4. **Al-Zahrani, I. A.** (2018). Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenge. *Saudi Med J*, *39*(9), 861-872. doi:10.15537/smj.2018.9.22840
5. **Albrich, W. C., Monnet, D. L., & Harbarth, S.** (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis*, *10*(3), 514-517. doi:10.3201/eid1003.030252
6. **Ambler, R. P.** (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *289*(1036), 321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
7. **Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frere, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., . . . Waley, S. G.** (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*, *276* ( Pt 1), 269-270. doi:10.1042/bj2760269
8. **Ambretti, S., Bassetti, M., Clerici, P., Petrosillo, N., Tumietto, F., Viale, P., & Rossolini, G. M.** (2019). Screening for carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in settings of high endemicity: a position paper from an Italian working group on CRE infections. *Antimicrob Resist Infect Control*, *8*, 136. doi:10.1186/s13756-019-0591-6
9. **Aminov, R. I.** (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol*, *2*, 158.
10. **Anderson, D. J., Chen, L. F., Schmadler, K. E., Sexton, D. J., Choi, Y., Link, K., . . . Kaye, K. S.** (2008). Poor functional status as a risk factor for surgical site infection due to methicillin-



resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29(9), 832-839. doi:10.1086/590124

11. **Antonelli, A., Arena, F., Giani, T., Colavecchio, O. L., Valeva, S. V., Paule, S., . . . Rossolini, G. M.** (2016). Performance of the BD MAX™ instrument with Check-Direct CPE real-time PCR for the detection of carbapenemase genes from rectal swabs, in a setting with endemic dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 86(1), 30-34.
12. **Arakawa, Y., Ohta, M., Kido, N., Fujii, Y., Komatsu, T., & Kato, N.** (1986). Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded  $\beta$  lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM  $\beta$ -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS letters*, 207(1), 69-74.
13. **Arason, V. A., Gunnlaugsson, A., Sigurdsson, J. A., Erlendsdottir, H., Gudmundsson, S., & Kristinsson, K. G.** (2002). Clonal spread of resistant pneumococci despite diminished antimicrobial use. *Microb Drug Resist*, 8(3), 187-192. doi:10.1089/107662902760326896
14. **Asai, N., Sakanashi, D., Suematsu, H., Kato, H., Hagihara, M., Nishiyama, N., . . . Mikamo, H.** (2018). The epidemiology and risk factor of carbapenem-resistant enterobacteriaceae colonization and infections: Case control study in a single institute in Japan. *J Infect Chemother*, 24(7), 505-509. doi:10.1016/j.jiac.2018.02.005
15. **Avlami, A., Bekris, S., Ganteris, G., Kraniotaki, E., Malamou-Lada, E., Orfanidou, M., . . . Platsouka, E.** (2010). Detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 185-187.
16. **Barnes, S. L., Morgan, D. J., Harris, A. D., Carling, P. C., & Thom, K. A.** (2014). Preventing the transmission of multidrug-resistant organisms: modeling the relative importance of hand hygiene and environmental cleaning interventions. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(9), 1156-1162.
17. **Baron, S.** (1996). In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
18. **Baym, M., Stone, L. K., & Kishony, R.** (2016). Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science*, 351(6268), aad3292.
19. **Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., & Pringle, M.** (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis*, 14, 13. doi:10.1186/1471-2334-14-13

20. **Ben-David, D., Masarwa, S., Navon-Venezia, S., Mishali, H., Fridental, I., Rubinovitch, B., . . . Israel, P. C. W. G.** (2011). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *32*(9), 845-853. doi:10.1086/661279
21. **Benenson, S., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y., Adler, A., Strahilevitz, J., Moses, A. E., & Block, C.** (2009). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* endocarditis in a young adult. Successful treatment with gentamicin and colistin. *Int J Infect Dis*, *13*(5), e295-298. doi:10.1016/j.ijid.2009.01.006
22. **Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D.** (2015). Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 396-396.
23. **Bennett, J. W., Herrera, M. L., Lewis, J. S., Wickes, B. W., & Jorgensen, J. H.** (2009). KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(1), 292-294.
24. **Bernabeu, S., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2012). Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *74*(1), 88-90. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.021
25. **Bhargava, A., Hayakawa, K., Silverman, E., Haider, S., Alluri, K. C., Datla, S., . . . Lephart, P. R.** (2014). Risk factors for colonization due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients: exposed to long-term acute care and acute care facilities. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *35*(4), 398-405.
26. **Bhargava, A., Hayakawa, K., Silverman, E., Haider, S., Alluri, K. C., Datla, S., . . . Kaye, K. S.** (2014). Risk factors for colonization due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients exposed to long-term acute care and acute care facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *35*(4), 398-405. doi:10.1086/675614
27. **Bogan, C., Kaye, K. S., Chopra, T., Hayakawa, K., Pogue, J. M., Lephart, P. R., . . . Marchaim, D.** (2014). Outcomes of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolation: matched analysis. *Am J Infect Control*, *42*(6), 612-620. doi:10.1016/j.ajic.2014.02.013
28. **Bogan, C., & Marchaim, D.** (2013). The role of antimicrobial stewardship in curbing carbapenem resistance. *Future Microbiology*, *8*(8), 979-991.
29. **Bongiovanni, M., Barilaro, G., Zanini, U., & Giuliani, G.** (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on multidrug-resistant hospital-acquired bacterial infections. *J Hosp Infect*, *123*, 191-192. doi:10.1016/j.jhin.2022.02.015

30. **Bonten, M. J.** (2012). Colonization pressure: a critical parameter in the epidemiology of antibiotic-resistant bacteria. *Crit Care*, *16*(4), 142. doi:10.1186/cc11417
31. **Borer, A., Saidel-Odes, L., Eskira, S., Nativ, R., Riesenber, K., Livshiz-Riven, I., . . . Peled, N.** (2012). Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant *K pneumoniae*. *Am J Infect Control*, *40*(5), 421-425.
32. **Borer, A., Saidel-Odes, L., Riesenber, K., Eskira, S., Peled, N., Nativ, R., . . . Sherf, M.** (2009). Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *30*(10), 972-976.
33. **Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E.** (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf*, *91*, 1-9.
34. **Bradford, P. A., Bratu, S., Urban, C., Visalli, M., Mariano, N., Landman, D., . . . Quale, J.** (2004). 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*, *39*(1), 55-60. doi:10.1086/421495
35. **Bratu, S., Mooty, M., Nichani, S., Landman, D., Gullans, C., Pettinato, B., . . . Quale, J.** (2005). Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(7), 3018-3020. doi:10.1128/AAC.49.7.3018-3020.2005
36. **Brisse, S., Issenhuth-Jeanjean, S., & Grimont, P. A.** (2004). Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *J Clin Microbiol*, *42*(8), 3388-3398. doi:10.1128/jcm.42.8.3388-3398.2004
37. **Broberg, C. A., Palacios, M., & Miller, V. L.** (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep*, *6*, 64. doi:10.12703/p6-64
38. **Brolund, A., Lagerqvist, N., Byfors, S., Struelens, M. J., Monnet, D. L., Albiger, B., & Kohlenberg, A.** (2019). Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill*, *24*(9), pii=1900123. doi:10.2807/1560-7917.Es.2019.24.9.1900123
39. **Brown, C., & Seidler, R. J.** (1973). Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl Microbiol*, *25*(6), 900-904. doi:10.1128/am.25.6.900-904.1973

40. **Buehlmann, M., Fankhauser, H., Laffer, R., Bregenzer, T., & Widmer, A. F.** (2010). The inguinal skin: an important site of colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *31*(4), 427-428. doi:10.1086/651309
41. **Burckhardt, I., & Zimmermann, S.** (2011). Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol*, *49*(9), 3321-3324.
42. **Burillo, A., Munoz, P., & Bouza, E.** (2019). Risk stratification for multidrug-resistant Gram-negative infections in ICU patients. *Curr Opin Infect Dis*, *32*(6), 626-637. doi:10.1097/QCO.0000000000000599
43. **Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., . . . Kutter, E.** (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), 894-896.
44. **Bush, K., & Fisher, J. F.** (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, *65*, 455-478. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102911
45. **Bush, K., & Jacoby, G. A.** (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(3), 969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
46. **Cano, A., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., Gracia-Ahufinger, I., Pérez-Nadales, E., Causse, M., . . . Kindelán, L.** (2018). Risks of infection and mortality among patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Validation of Scores and Proposal for Management. *Clinical Infectious Diseases*, *66*(8), 1204-1210.
47. **Cano, A., Gutierrez-Gutierrez, B., Machuca, I., Gracia-Ahufinger, I., Perez-Nadales, E., Causse, M., . . . Torre-Cisneros, J.** (2018). Risks of Infection and Mortality Among Patients Colonized With *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Validation of Scores and Proposal for Management. *Clin Infect Dis*, *66*(8), 1204-1210. doi:10.1093/cid/cix991
48. **Canton, R., Akova, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., . . . European Network on Carbapenemases.** (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*, *18*(5), 413-431. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x
49. **Caplenas, N. R., Kanarek, M. S., & Dufour, A. P.** (1981). Source and extent of *Klebsiella pneumoniae* in the paper industry. *Appl Environ Microbiol*, *42*(5), 779-785. doi:10.1128/aem.42.5.779-785.1981

50. **Carpenter, J. L.** (1990). Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis*, 12(4), 672-682. doi:10.1093/clinids/12.4.672
51. **Carrer, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, O. A., Feriha, C., Cuzon, G., . . . Nordmann, P.** (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 1369-1373. doi:10.1128/AAC.01312-09
52. **Castanheira, M., Deshpande, L. M., Woosley, L. N., Serio, A. W., Krause, K. M., & Flamm, R. K.** (2018). Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(12), 3346-3354.
53. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2009). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 58(10), 256-260.
54. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
55. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2015). Facility guidance for control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) : November 2015 update - CRE toolkit. Retrieved from <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/79104>
56. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2016). Tracking CRE infections. Retrieved from <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html>
57. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2018). FAQs about choosing and implementing a CRE definition. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#Definition>
58. **Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R.** (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*, 40(5), 373-383. doi:10.1016/0021-9681(87)90171-8
59. **Chaves, J., Ladona, M. G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., & Ampurdanés, C.** (2001). SHV-1  $\beta$ -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(10), 2856-2861.

60. **Chu, W., Hang, X., Li, X., Ye, N., Tang, W., Zhang, Y., . . . Liu, Z.** (2022). Bloodstream Infections in Patients with Rectal Colonization by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Prospective Cohort Study. *Infect Drug Resist*, 6051-6063.
61. **Chu, Y. W., Cheung, T. K., Ngan, J. Y., & Kam, K. M.** (2005). EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents*, 26(4), 340-341. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.07.004
62. **Chung, K. P., Tseng, S. P., Huang, Y. T., Tsai, T. H., Teng, L. J., & Hsueh, P. R.** (2011). Arrival of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*, 66(5), 1182-1184. doi:10.1093/jac/dkr025
63. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty Seventh Edition: M100*. Retrieved from [https://clsi.org/media/1469/m100s27\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1469/m100s27_sample.pdf)
64. **Codjoe, F. S., & Donkor, E. S.** (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)*, 6(1). doi:10.3390/medsci6010001
65. **Compain, F., Gallah, S., Eckert, C., Arlet, G., Ramahefasolo, A., Decre, D., . . . Podglajen, I.** (2016). Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic beta Carba Test. *J Clin Microbiol*, 54(12), 3065-3068. doi:10.1128/JCM.01912-16
66. **Cooke, E. M., Brayson, J. C., Edmondson, A. S., & Hall, D.** (1979). An investigation into the incidence and sources of *klebsiella* infections in hospital patients. *J Hyg (Lond)*, 82(3), 473-480. doi:10.1017/s0022172400053997
67. **Crooks, V., Waller, S., Smith, T., & Hahn, T. J.** (1991). The use of the Karnofsky Performance Scale in determining outcomes and risk in geriatric outpatients. *J Gerontol*, 46(4), M139-144. doi:10.1093/geronj/46.4.m139
68. **Crowder, M. W., Spencer, J., & Vila, A. J.** (2006). Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Acc Chem Res*, 39(10), 721-728. doi:10.1021/ar0400241
69. **Cui, X., Zhang, H., & Du, H.** (2019). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: detection and antimicrobial therapy. *Front Microbiol*, 10, 1823.

70. **Cui, X., Zhang, H., & Du, H.** (2019). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol*, *10*, 1823. doi:10.3389/fmicb.2019.01823
71. **Daikos, G., Skiada, A., Pavleas, J., Vafiadi, C., Salatas, K., Tofas, P., . . . Vafiadi, I.** (2010). Serum bactericidal activity of three different dosing regimens of colistin with implications for optimum clinical use. *J Chemother*, *22*(3), 175-178.
72. **Daikos, G. L., Karabinis, A., Paramythiotou, E., Syriopoulou, V. P., Kosmidis, C., Avlami, A., . . . Malamou-Lada, H.** (2007). VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: analysis of 28 cases. *Int J Antimicrob Agents*, *29*(4), 471-473. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.11.006
73. **Daikos, G. L., Markogiannakis, A., Souli, M., & Tzouvelekis, L. S.** (2012). Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *10*(12), 1393-1404. doi:10.1586/eri.12.138
74. **Daikos, G. L., Petrikkos, P., Psychogiou, M., Kosmidis, C., Vryonis, E., Skoutelis, A., . . . Petrikkos, G.** (2009). 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*, *53*(5), 1868-1873. doi:10.1128/AAC.00782-08
75. **Daikos, G. L., Tsaousi, S., Tzouvelekis, L. S., Anyfantis, I., Psychogiou, M., Argyropoulou, A., . . . Nepka, M.** (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, *58*(4), 2322-2328.
76. **Daikos, G. L., Vryonis, E., Psychogiou, M., Tzouvelekis, L. S., Liatis, S., Petrikkos, P., . . . Skoutelis, A.** (2010). Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, *65*(4), 784-788. doi:10.1093/jac/dkq005
77. **Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. A., Castro, M. E., Stier, C. J., Bragagnolo, K. L., . . . Woodford, N.** (2003). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*, *41*(7), 3403-3406. doi:10.1128/jcm.41.7.3403-3406.2003
78. **Dancer, S. J.** (2014). Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev*, *27*(4), 665-690.

79. **Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Gomaa, H. H., Noronha, B., & Udo, E. E.** (2010). 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*, 59(Pt 6), 687-692. doi:10.1099/jmm.0.019208-0
80. **Datta, N., & Kontomichalou, P.** (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007), 239-241. doi:10.1038/208239a0
81. **Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Weaver, B., Aziz, M., Gauld, L., . . . Price, L. B.** (2015). Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. *Clin Infect Dis*, 61(6), 892-899. doi:10.1093/cid/civ428
82. **Davis, T. J., & Matsen, J. M.** (1974). Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. *J Infect Dis*, 130(4), 402-405. doi:10.1093/infdis/130.4.402
83. **Debby, B., Ganor, O., Yasmin, M., David, L., Nathan, K., Ilana, T., . . . Galia, R.** (2012). Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(8), 1811-1817.
84. **Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A.** (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol*, 154(1), 9-16. doi:10.1016/s0923-2508(02)00004-9
85. **Dobrindt, U., & Hacker, J.** (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(5), 550-557.
86. **Doi, Y., Potoski, B. A., Adams-Haduch, J. M., Sidjabat, H. E., Pasculle, A. W., & Paterson, D. L.** (2008). Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol*, 46(12), 4083-4086. doi:10.1128/JCM.01408-08
87. **Donnenberg, M. S.** (2015). 220 - Enterobacteriaceae. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* (pp. 2503-2517.e2505). Philadelphia: W.B. Saunders.
88. **Dortet, L., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2014). Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*, 2014, 249856. doi:10.1155/2014/249856



89. **Duncan, D. W., & Razzell, W. E.** (1972). Klebsiella biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. *Appl Microbiol*, 24(6), 933-938. doi:10.1128/am.24.6.933-938.1972
90. **DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., . . . Kalas, J. P.** (1971). Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *N Engl J Med*, 285(1), 1-9. doi:10.1056/nejm197107012850101
91. **Edwards, P. R., & Ewing, W. H.** (1986). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae* (4th ed.). New York: Elsevier.
92. **Eser, F., Yilmaz, G. R., Guner, R., Hasanoglu, I., Urkmez Korkmaz, F. Y., Acikgoz, Z. C., & Tasyaran, M. A.** (2019). Risk factors for rectal colonization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital: a case-control study from Turkey. *Turk J Med Sci*, 49(1), 341-346. doi:10.3906/sag-1810-65
93. **European Centre for Disease Prevention and Control.** (2020). *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report*. Retrieved from Stockholm, ECDC; 2022:
94. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** (2014). Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae through cross-border transfer of patients. In: ECDC Stockholm.
95. **European Centre for Disease Prevention and Control, E. F. S. A., European Medicines Agency.** (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals: Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA Journal*, 15(7), e04872.
96. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** (2017). *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance* [2.0]. Retrieved from [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)
97. **Evagelopoulou, P., Myrianthefs, P., Markogiannakis, A., Baltopoulos, G., & Tsakris, A.** (2008). Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae mediastinitis safely and effectively treated with prolonged administration of tigecycline. *Clin Infect Dis*, 46(12), 1932-1933. doi:10.1086/588557

98. **Fader, R. C., & Davis, C. P.** (1982). Klebsiella Pneumoniae-Induced Experimental Pyelitis: The Effect of Filiation on Infectivity. *J Urol*, *128*(1), 197-201. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)52817-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)52817-7)
99. **Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Kofteridis, D., Vartzili, S., Chelvatoglou, F. C., Papaioannou, V., . . . Michalopoulos, A.** (2007). Risk factors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections: a matched case control study. *J Antimicrob Chemother*, *60*(5), 1124-1130. doi:10.1093/jac/dkm356
100. **Falagas, M. E., Vardakas, K. Z., Tsiveriotis, K. P., Triarides, N. A., & Tansarli, G. S.** (2014). Effectiveness and safety of high-dose tigecycline-containing regimens for the treatment of severe bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*, *44*(1), 1-7.
101. **Falcone, M., Suardi, L. R., Tiseo, G., Galfo, V., Occhineri, S., Verdenelli, S., . . . Menichetti, F.** (2022). Superinfections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales in hospitalized patients with COVID-19: a multicentre observational study from Italy (CREVID Study). *JAC Antimicrob Resist*, *4*(3), dlac064. doi:10.1093/jacamr/dlac064
102. **Falcone, M., Tiseo, G., Galfo, V., Giordano, C., Leonildi, A., Marciano, E., . . . Barnini, S.** (2022). Bloodstream infections in patients with rectal colonization by Klebsiella pneumoniae producing different type of carbapenemases: a prospective, cohort study (CHIMERA study). *Clinical Microbiology and Infection*, *28*(2), 298. e291-298. e297.
103. **Finlay, B. B., & Falkow, S.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*(2), 136-169. doi:10.1128/mubr.61.2.136-169.1997
104. **Fleming, A.** (1945). Penicillin. Nobel Lecture, 11 December 1945. Retrieved from <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>
105. **Forbes, B., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S.** (2002). *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* (11th ed.). St. Louis: Mosby.
106. **Galani, I., Karaiskos, I., Karantani, I., Papoutsaki, V., Maraki, S., Papaioannou, V., . . . On Behalf Of The Study, C.** (2018). Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece, 2014 to 2016. *Euro Surveill*, *23*(31). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.30.1700775
107. **Galani, I., Souli, M., Chryssouli, Z., Orlandou, K., & Giamarellou, H.** (2005). Characterization of a new integron containing bla(VIM-1) and aac(6')-IIc in an Enterobacter

- cloacae clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother*, 55(5), 634-638. doi:10.1093/jac/dki073
108. **Gasink, L. B., Edelstein, P. H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M., & Fishman, N. O.** (2009). Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30(12), 1180-1185. doi:10.1086/648451
109. **Gastmeier, P., Groneberg, K., Weist, K., & Ruden, H.** (2003). A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: Identification of transmission and intervention. *Am J Infect Control*, 31(7), 424-430. doi:10.1067/mic.2003.70
110. **Geladari, A., Karamatakis, T., Antachopoulos, C., Iosifidis, E., Tsiatsiou, O., Politi, L., . . . Roilides, E.** (2017). Epidemiological surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacteria in a solid organ transplantation department. *Transpl Infect Dis*, 19(3). doi:10.1111/tid.12686
111. **Giakkoupi, P., Papagiannitsis, C. C., Miriagou, V., Pappa, O., Polemis, M., Tryfinopoulou, K., . . . Vatopoulos, A. C.** (2011). An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(7), 1510-1513.
112. **Giakkoupi, P., Papagiannitsis, C. C., Miriagou, V., Pappa, O., Polemis, M., Tryfinopoulou, K., . . . Vatopoulos, A. C.** (2011). An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother*, 66(7), 1510-1513. doi:10.1093/jac/dkr166
113. **Giakkoupi, P., Xanthaki, A., Kanelopoulou, M., Vlahaki, A., Miriagou, V., Kontou, S., . . . Legakis, N.** (2003). VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol*, 41(8), 3893-3896.
114. **Giannella, M., Pascale, R., Gutierrez-Gutierrez, B., Cano, A., & Viale, P.** (2019). The use of predictive scores in the management of patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 17(4), 265-273. doi:10.1080/14787210.2019.1595590
115. **Giannella, M., Treçarichi, E. M., De Rosa, F. G., Del Bono, V., Bassetti, M., Lewis, R. E., . . . Tumbarello, M.** (2014). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. *Clin Microbiol Infect*, 20(12), 1357-1362. doi:10.1111/1469-0691.12747

116. **Giannini, M. A., Gilliam, C., Owings, A., Glover, B., Gipson, M., & Hakim, H.** (2017). Does colonization with Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae correlate to infection? *Am J Infect Control*, 45(6), S37.
117. **Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2012). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 50(2), 477-479. doi:10.1128/JCM.05247-11
118. **Giske, C. G., Gezelius, L., Samuelsen, O., Warner, M., Sundsfjord, A., & Woodford, N.** (2011). 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*, 17(4), 552-556. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x
119. **Gomez-Simmonds, A., Annavajhala, M. K., McConville, T. H., Dietz, D. E., Shoucri, S. M., Laracy, J. C., . . . Uhlemann, A. C.** (2021). Carbapenemase-producing Enterobacterales causing secondary infections during the COVID-19 crisis at a New York City hospital. *J Antimicrob Chemother*, 76(2), 380-384. doi:10.1093/jac/dkaa466
120. **Gorbach, S. L., Bartlett, J. G., & Blacklow, N. R.** (1992). *Infectious Diseases*. Philadelphia: W. B. Saunders.
121. **Gordon, D. M., & FitzGibbon, F.** (1999). The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. *Microbiology (Reading)*, 145 ( Pt 10), 2663-2671. doi:10.1099/00221287-145-10-2663
122. **Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M.** (2010). *Ιατρική Μικροβιολογία: Μικροβιακές λοιμώξεις, παθογένεια, ανοσία, εργαστηριακή διάγνωση και θεραπεία* (Α. Τσακρής Ed. Vol. 1). Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.
123. **Gregory, C. J., Llata, E., Stine, N., Gould, C., Santiago, L. M., Vazquez, G. J., . . . Tomashek, K. M.** (2010). Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31(5), 476-484. doi:10.1086/651670
124. **Grundmann, H., Glasner, C., Albiger, B., Aanensen, D. M., Tomlinson, C. T., Andrasević, A. T., . . . Monnet, D. L.** (2017). Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*, 17(2), 153-163. doi:10.1016/s1473-3099(16)30257-2

125. **Guducuoglu, H., Gursoy, N. C., Yakupogullari, Y., Parlak, M., Karasin, G., Sunnetcioglu, M., & Otlu, B.** (2018). Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae*: High Mortality from Pandrug Resistance. *Microb Drug Resist*, *24*(7), 966-972. doi:10.1089/mdr.2017.0173
126. **Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., & Kallen, A. J.** (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*, *53*(1), 60-67. doi:10.1093/cid/cir202
127. **Gutierrez-Gutierrez, B., Salamanca, E., de Cueto, M., Hsueh, P. R., Viale, P., Pano-Pardo, J. R., . . . Investigators, R. E. I.** (2017). Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*, *17*(7), 726-734. doi:10.1016/S1473-3099(17)30228-1
128. **Halaby, T., Reuland, A. E., Al Naiemi, N., Potron, A., Savelkoul, P. H., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Nordmann, P.** (2012). A case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(5), 2790-2791. doi:10.1128/AAC.001111-12
129. **Hall, B. G., & Barlow, M.** (2004). Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*, *7*(2), 111-123. doi:10.1016/j.drug.2004.02.003
130. **Hall, B. G., & Barlow, M.** (2005). Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, *55*(6), 1050-1051. doi:10.1093/jac/dki130
131. **Hansen, D. S., Gottschau, A., & Kolmos, H. J.** (1998). Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect*, *38*(2), 119-132. doi:10.1016/s0195-6701(98)90065-2
132. **Harris, A. D., Kotetishvili, M., Shurland, S., Johnson, J. A., Morris, J. G., Nemoy, L. L., & Johnson, J. K.** (2007). How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control*, *35*(2), 97-101.
133. **Harris, A. D., Perencevich, E. N., Johnson, J. K., Paterson, D. L., Morris, J. G., Strauss, S. M., & Johnson, J. A.** (2007). Patient-to-patient transmission is important in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* acquisition. *Clin Infect Dis*, *45*(10), 1347-1350. doi:10.1086/522657

134. **Hemarajata, P., Yang, S., Hindler, J. A., & Humphries, R. M.** (2015). Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-Like beta-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(9), 5574-5580. doi:10.1128/AAC.00425-15
135. **Hrabak, J., Walkova, R., Studentova, V., Chudackova, E., & Bergerova, T.** (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, *49*(9), 3222-3227. doi:10.1128/JCM.00984-11
136. **Huang, T.-D., Bogaerts, P., Ghilani, E., Heinrichs, A., Gavage, P., Roisin, S., . . . Denis, O.** (2015). Multicentre evaluation of the Check-Direct CPE® assay for direct screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rectal swabs. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *70*(6), 1669-1673.
137. **Huang, T. D., Bogaerts, P., Ghilani, E., Heinrichs, A., Gavage, P., Roisin, S., . . . Glupczynski, Y.** (2015). Multicentre evaluation of the Check-Direct CPE(R) assay for direct screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother*, *70*(6), 1669-1673. doi:10.1093/jac/dkv009
138. **Ikonomidis, A., Tokatlidou, D., Kristo, I., Sofianou, D., Tsakris, A., Mantzana, P., . . . Maniatis, A. N.** (2005). Outbreaks in distinct regions due to a single Klebsiella pneumoniae clone carrying a bla VIM-1 metallo-β-lactamase gene. *J Clin Microbiol*, *43*(10), 5344-5347.
139. **Jaiswal, S. R., Gupta, S., Kumar, R. S., Sherawat, A., Rajoreya, A., Dash, S. K., . . . Chakrabarti, S.** (2018). Gut colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae adversely impacts the outcome in patients with hematological malignancies: results of a prospective surveillance study. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *10*(1).
140. **Jaurin, B., & Grundstrom, T.** (1981). 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*, *78*(8), 4897-4901. doi:10.1073/pnas.78.8.4897
141. **Jeon, B. C., Jeong, S. H., Bae, I. K., Kwon, S. B., Lee, K., Young, D., . . . Lee, S. H.** (2005). Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 beta-lactamase in korea. *J Clin Microbiol*, *43*(5), 2241-2245. doi:10.1128/JCM.43.5.2241-2245.2005
142. **Jeong, S. H., Bae, I. K., Kim, D., Hong, S. G., Song, J. S., Lee, J. H., & Lee, S. H.** (2005). First outbreak of Klebsiella pneumoniae clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-

- spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11), 4809-4810. doi:10.1128/AAC.49.11.4809-4810.2005
143. **Johnson, S. W., Anderson, D. J., May, D. B., & Drew, R. H.** (2013). Utility of a clinical risk factor scoring model in predicting infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae on hospital admission. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(4), 385-392.
144. **Jorgensen, S. C. J., Trinh, T. D., Zasowski, E. J., Lagnf, A. M., Bhatia, S., Melvin, S. M., . . . Rybak, M. J.** (2020). Evaluation of the INCREMENT-CPE, Pitt Bacteremia and qPitt Scores in Patients with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections Treated with Ceftazidime–Avibactam. *Infectious Diseases and Therapy*, 9(2), 291-304. doi:10.1007/s40121-020-00288-4
145. **Kandolo, K., & Wauters, G.** (1985). Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J Clin Microbiol*, 21(6), 980-982. doi:10.1128/jcm.21.6.980-982.1985
146. **Karmali, M. A.** (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 2(1), 15-38. doi:10.1128/cmr.2.1.15
147. **Kaye, K., Marchaim, D., Thamlikitkul, V., Carmeli, Y., Chiu, C., Daikos, G., . . . Kotanidou, A.** (2021). *Results from the OVERCOME trial: Colistin monotherapy versus combination therapy for the treatment of pneumonia or bloodstream infection due to extensively drug resistant Gram-negative bacilli*. Paper presented at the Proceedings of the 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
148. **Kazmierczak, K. M., Karlowsky, J. A., de Jonge, B. L., Stone, G. G., & Sahm, D. F.** (2021). Epidemiology of carbapenem resistance determinants identified in meropenem-nonsusceptible Enterobacterales collected as part of a global surveillance program, 2012 to 2017. *Antimicrob Agents Chemother*, 65(7), e02000-02020.
149. **Kofteridis, D. P., Valachis, A., Dimopoulou, D., Maraki, S., Christidou, A., Mantadakis, E., & Samonis, G.** (2014). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: a case-case-control study. *J Infect Chemother*, 20(5), 293-297. doi:10.1016/j.jiac.2013.11.007
150. **Kontopoulou, K., Protonotariou, E., Vasilakos, K., Kriti, M., Koteli, A., Antoniadou, E., & Sofianou, D.** (2010). Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2  $\beta$ -lactamase resistant to colistin. *Journal of Hospital Infection*, 76(1), 70-73.

151. **Ku, Y.-H., Chen, C.-C., Lee, M.-F., Chuang, Y.-C., Tang, H.-J., & Yu, W.-L.** (2017). Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates or with carbapenem resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *50*(6), 931-939.
152. **Kwak, Y. G., Choi, S. H., Choo, E. J., Chung, J. W., Jeong, J. Y., Kim, N. J., . . . Kim, Y. S.** (2005). Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among hospitalized patients. *Microb Drug Resist*, *11*(2), 165-169. doi:10.1089/mdr.2005.11.165
153. **Lübbert, C., Becker-Rux, D., Rodloff, A., Laudi, S., Busch, T., Bartels, M., & Kaisers, U.** (2014). Colonization of liver transplant recipients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with high infection rates and excess mortality: a case-control analysis. *Infection*, *42*(2), 309-316.
154. **Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D., & Quale, J.** (2015). Activity of imipenem with relebactam against Gram-negative pathogens from New York City. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(8), 5029-5031.
155. **Lau, A. F., Fahle, G. A., Kemp, M. A., Jassem, A. N., Dekker, J. P., & Frank, K. M.** (2015). Clinical performance of Check-Direct CPE, a multiplex PCR for direct detection of bla KPC, bla NDM and/or bla VIM, and bla OXA-48 from perirectal swabs. *J Clin Microbiol*, *53*(12), 3729-3737.
156. **Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M.** (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, *43*(7), 1584-1590. doi:10.1128/AAC.43.7.1584
157. **Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B., Kim, Y. A., Yong, D., & Yum, J. H.** (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*, *7*(2), 88-91. doi:10.1046/j.1469-0691.2001.00204.x
158. **Li, J., Li, Y., Song, N., & Chen, Y.** (2020). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: A meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*, *21*, 306-313. doi:10.1016/j.jgar.2019.09.006
159. **Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H.** (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*, *28*(2), 337-418.



160. **Li, Y., Shen, H., Zhu, C., & Yu, Y.** (2019). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections among ICU Admission Patients in Central China: Prevalence and Prediction Model. *Biomed Res Int*, 2019, 9767313. doi:10.1155/2019/9767313
161. **Lin, M. Y., Lyles-Banks, R. D., Lolans, K., Hines, D. W., Spear, J. B., Petrak, R., . . . Epicenters Program.** (2013). The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*, 57(9), 1246-1252. doi:10.1093/cid/cit500
162. **Lin, M. Y., Ray, M. J., Rezny, S., Runningdeer, E., Weinstein, R. A., & Trick, W. E.** (2019). Predicting Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Carriage at the Time of Admission Using a Statewide Hospital Discharge Database. *Open Forum Infect Dis*, 6(12), ofz483. doi:10.1093/ofid/ofz483
163. **Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., . . . Huang, X.** (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.
164. **Livermore, D. M.** (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8(4), 557-584.
165. **Livermore, D. M., & Brown, D. F.** (2001). Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(suppl\_1), 59-64.
166. **Lushniak, B. D.** (2014). Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Reports*, 129(4), 314-316.
167. **Machuca, I., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Pérez Cortés, S., Gracia-Ahufinger, I., Serrano, J., Madrigal, M. D., . . . Torre-Cisneros, J.** (2016). Oral decontamination with aminoglycosides is associated with lower risk of mortality and infections in high-risk patients colonized with colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(11), 3242-3249.
168. **Machuca, I., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Rivera-Espinar, F., Cano, A., Gracia-Ahufinger, I., Guzman-Puche, J., . . . Bonomo, R. A.** (2019). External validation of the INCREMENT-CPE mortality score in a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia cohort: the prognostic significance of colistin resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 54(4), 442-448.

169. **MacPherson, D. W., Gushulak, B. D., Baine, W. B., Bala, S., Gubbins, P. O., Holtom, P., & Segarra-Newnham, M.** (2009). Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerging infectious diseases*, *15*(11), 1727.
170. **Magiorakos, A. P., Burns, K., Rodríguez Baño, J., Borg, M., Daikos, G., Dumpis, U., . . . Weber, J. T.** (2017). 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. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *6*(1), 113. doi:10.1186/s13756-017-0259-z
171. **Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., . . . Monnet, D. L.** (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268-281. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
172. **Maltezou, H. C., Giakkoupi, P., Maragos, A., Bolikas, M., Raftopoulos, V., Papahatzaki, H., . . . Vatopoulos, A. C.** (2009). Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect*, *58*(3), 213-219. doi:10.1016/j.jinf.2009.01.010
173. **Mandell, G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R.** (2000). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (5th ed.): Churchill Livingstone/Elsevier.
174. **Marchaim, D., Chopra, T., Bhargava, A., Bogan, C., Dhar, S., Hayakawa, K., . . . Shango, M.** (2012). Recent exposure to antimicrobials and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the role of antimicrobial stewardship. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *33*(8), 817-830.
175. **Marchaim, D., Chopra, T., Bogan, C., Bheemreddy, S., Sengstock, D., Jagarlamudi, R., . . . Lephart, P. R.** (2012). The burden of multidrug-resistant organisms on tertiary hospitals posed by patients with recent stays in long-term acute care facilities. *Am J Infect Control*, *40*(8), 760-765.
176. **Marchaim, D., Chopra, T., Perez, F., Hayakawa, K., Lephart, P. R., Bheemreddy, S., . . . Shango, M.** (2011). Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at Detroit medical center. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *32*(9), 861-871.

177. **Mariotte-Boyer, S., Nicolas-Chanoine, M. H., & Labia, R.** (1996). A kinetic study of NMC-A beta-lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. *FEMS Microbiol Lett*, *143*(1), 29-33. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08457.x
178. **Martin, E. T., Tansek, R., Collins, V., Hayakawa, K., Abreu-Lanfranco, O., Chopra, T., . . . Marchaim, D.** (2013). The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae score: a bedside score to rule out infection with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among hospitalized patients. *Am J Infect Control*, *41*(2), 180-182. doi:10.1016/j.ajic.2012.02.036
179. **Mathers, A. J., Vegesana, K., German-Mesner, I., Ainsworth, J., Pannone, A., Crook, D. W., . . . Eyre, D. W.** (2020). Risk factors for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene acquisition and clinical outcomes across multiple bacterial species. *J Hosp Infect*, *104*(4), 456-468. doi:10.1016/j.jhin.2020.01.005
180. **Mavroidi, A., Miriagou, V., Malli, E., Stefanos, A., Dalekos, G. N., Tzouveleki, L. S., & Petinaki, E.** (2012). Emergence of *Escherichia coli* sequence type 410 (ST410) with KPC-2  $\beta$ -lactamase. *Int J Antimicrob Agents*, *39*(3), 247-250.
181. **McConville, T. H., Sullivan, S. B., Gomez-Simmonds, A., Whittier, S., & Uhlemann, A.-C.** (2017). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS One*, *12*(10), e0186195.
182. **Medrzycka-Dabrowska, W., Lange, S., Zorena, K., Dabrowski, S., Ozga, D., & Tomaszek, L.** (2021). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in ICU COVID-19 Patients-A Scoping Review. *J Clin Med*, *10*(10). doi:10.3390/jcm10102067
183. **Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V. J., & Tomás, J. M.** (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*, *60*(6), 2529-2535. doi:10.1128/iai.60.6.2529-2535.1992
184. **Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M.** (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*, *2*, 145.
185. **Michalopoulos, A., Vartzili, S., Rafailidis, P., Chalevelakis, G., Damala, M., & Falagas, M.** (2010). Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*(2), 184-186.

186. **Miethke, M., & Marahiel, M. A.** (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, *71*(3), 413-451. doi:10.1128/mmbr.00012-07
187. **Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. G., Gniadkowski, M., . . . Canton, R.** (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*, *16*(2), 112-122. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x
188. **Miriagou, V., Tzelepi, E., Gianneli, D., & Tzouvelekis, L. S.** (2003). Escherichia coli with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(1), 395-397. doi:10.1128/aac.47.1.395-397.2003
189. **Miriagou, V., Tzelepi, E., Gianneli, D., & Tzouvelekis, L. S.** (2003). Escherichia coli with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-β-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(1), 395-397.
190. **Monnet, D. L.** (2014). How to Measure Antimicrobial Consumption. Retrieved from [https://www.whocc.no/ddd/definition\\_and\\_general\\_considera/](https://www.whocc.no/ddd/definition_and_general_considera/)
191. **Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., . . . Hayden, M. K.** (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, *13*(9), 785-796.
192. **Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., . . . Wool, E.** (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629-655.
193. **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., & Pfaller, M. A.** (1998). Enterobacteriaceae. In *Medical microbiology* (Third ed., pp. 232-244). Missouri: Mosby Inc.
194. **Naas, T., Dortet, L., & Iorga, B. I.** (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets*, *17*(9), 1006-1028. doi:10.2174/1389450117666160310144501
195. **Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., & Nordmann, P.** (2005). Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*, *43*(9), 4826-4829. doi:10.1128/JCM.43.9.4826-4829.2005

196. **National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases. Division of Healthcare Quality Promotion.** (2015). Facility guidance for control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) : November 2015 update - CRE toolkit. Retrieved from <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/79104>
197. NCBI taxonomy. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
198. **Niemelä, S. I., & Väättänen, P.** (1982). Survival in lake water of *Klebsiella pneumoniae* discharged by a paper mill. *Appl Environ Microbiol*, *44*(2), 264-269. doi:10.1128/aem.44.2.264-269.1982
199. **Nordmann, P.** (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Medecine et maladies infectieuses*, *44*(2), 51-56.
200. **Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T.** (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, *9*(4), 228-236. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4
201. **Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L.** (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, *17*(10), 1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655
202. **Nordmann, P., & Poirel, L.** (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, *68*(3), 487-489. doi:10.1093/jac/dks426
203. **Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L.** (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, *18*(9), 1503-1507. doi:10.3201/eid1809.120355
204. **Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R.** (2011). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*, *66*(4), 689-692. doi:10.1093/jac/dkq520
205. **Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., & Livermore, D. M.** (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*, *19*(12), 588-595. doi:10.1016/j.tim.2011.09.005
206. **Nouvenne, A., Ticinesi, A., & Meschi, T.** (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in elderly frail patients admitted to medical wards. In (Vol. 9, pp. 116-119).
207. **O'neill, J.** (2016). Tackling drug-resistant infections globally: an overview of our work. *The review on antimicrobial resistance*. London: Wellcome Trust. Retrieved from [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)

208. **Oliva, A., Mascellino, M. T., Cipolla, A., D'Abramo, A., De Rosa, A., Savinelli, S., . . . Vullo, V.** (2015). Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. *International Journal of Infectious Diseases*, *33*, 132-134.
209. **Oren, I., Sprecher, H., Finkelstein, R., Hadad, S., Neuberger, A., Hussein, K., . . . Henig, I.** (2013). Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: a prospective controlled trial. *Am J Infect Control*, *41*(12), 1167-1172.
210. **Ouellette, M., Bissonnette, L., & Roy, P. H.** (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(21), 7378-7382. doi:10.1073/pnas.84.21.7378
211. **Paczosa, M. K., & Meccas, J.** (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*, *80*(3), 629-661. doi:10.1128/mnbr.00078-15
212. **Paganin, F., Lilienthal, F., Bourdin, A., Lugagne, N., Tixier, F., Génin, R., & Yvin, J.-L.** (2004). Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *European Respiratory Journal*, *24*(5), 779-785. doi:10.1183/09031936.04.00119503
213. **Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D.** (2016). The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. *Microbiome*, *4*(1), 1-15.
214. **Palacios-Baena, Z. R., Giannella, M., Manissero, D., Rodriguez-Bano, J., Viale, P., Lopes, S., . . . Longshaw, C.** (2021). Risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*, *27*(2), 228-235. doi:10.1016/j.cmi.2020.10.016
215. **Papadimitriou-Olivgeris, M., Bartzavali, C., Georgakopoulou, A., Kolonitsiou, F., Mplani, V., Spiliopoulou, I., . . . Marangos, M.** (2021). External validation of INCREMENT-CPE score in a retrospective cohort of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in critically ill patients. *Clinical Microbiology and Infection*, *27*(6), 915. e911-915. e913.
216. **Papadimitriou-Olivgeris, M., Marangos, M., Fligou, F., Christofidou, M., Bartzavali, C., Anastassiou, E. D., & Filos, K. S.** (2012). Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob Chemother*, *67*(12), 2976-2981. doi:10.1093/jac/dks316

217. **Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., & Corso, A.** (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 47(6), 1631-1639.
218. **Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., & Corso, A.** (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 47(6), 1631-1639. doi:10.1128/JCM.00130-09
219. **Patel, G., Huprikar, S., Factor, S. H., Jenkins, S. G., & Calfee, D. P.** (2008). Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29(12), 1099-1106. doi:10.1086/592412
220. **Paterson, D.** (2012). Infections due to other Members of the *Enterobacteriaceae*, including Management of Multi-Drug Resistant Strains. In A. Schafer (Ed.), *Cecil Medicine* (24th ed.): Elsevier-Saunders.
221. **Paterson, D. L., & Bonomo, R. A.** (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
222. **Paton, R., Miles, R. S., Hood, J., Amyes, S. G., Miles, R. S., & Amyes, S. G.** (1993). ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, 2(2), 81-87. doi:10.1016/0924-8579(93)90045-7
223. **Paul, M., Carrara, E., Retamar, P., Tängdén, T., Bitterman, R., Bonomo, R. A., . . . Harbarth, S.** (2022). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clinical Microbiology and Infection*, 28(4), 521-547.
224. **Paul, M., Daikos, G. L., Durante-Mangoni, E., Yahav, D., Carmeli, Y., Benattar, Y. D., . . . Nutman, A.** (2018). Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet infectious diseases*, 18(4), 391-400.
225. **Paul, M., Shani, V., Muchtar, E., Kariv, G., Robenshtok, E., & Leibovici, L.** (2010). Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11), 4851-4863. doi:10.1128/AAC.00627-10

226. **Pavan Kumar, D. V., Mohan, J., Rakesh, P. S., Prasad, J., & Joseph, L.** (2017). Bacteriological profile of neonatal sepsis in a secondary care hospital in rural Tamil Nadu, Southern India. *J Family Med Prim Care*, 6(4), 735-738. doi:10.4103/jfmpc.jfmpc\_66\_17
227. **Perez, F., Pultz, M. J., Endimiani, A., Bonomo, R. A., & Donskey, C. J.** (2011). Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6), 2585-2589. doi:10.1128/AAC.00891-10
228. **Pierce, V. M., Simner, P. J., Lonsway, D. R., Roe-Carpenter, D. E., Johnson, J. K., Brasso, W. B., . . . Das, S.** (2017). Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 55(8), 2321-2333. doi:10.1128/JCM.00193-17
229. **Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouvelekis, L. S., & Daikos, G. L.** (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatr Infect Dis J*, 36(10), 1002-1005. doi:10.1097/inf.0000000000001675
230. **Pisney, L. M., Barron, M., Kassner, E., Havens, D., & Madinger, N.** (2014). Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Rectal Screening during an Outbreak of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* at an Acute Care Hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(4), 434-436.
231. **Podschun, R., Heineken, P., Ullmann, U., & Sonntag, H. G.** (1986). Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 262(3), 335-345. doi:10.1016/s0176-6724(86)80006-2
232. **Podschun, R., & Sahly, H.** (1991). Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 191(1), 46-52.
233. **Podschun, R., & Ullmann, U.** (1992). *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*, 36(4), 250-254. doi:10.1099/00222615-36-4-250
234. **Podschun, R., & Ullmann, U.** (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 11(4), 589-603. doi:10.1128/cmr.11.4.589



235. **Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., & Nordmann, P.** (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, *48*(1), 15-22. doi:10.1128/aac.48.1.15-22.2004
236. **Poirel, L., & Nordmann, P.** (2015). Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol*, *53*(9), 3003-3008. doi:10.1128/JCM.00977-15
237. **Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P.** (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*, *67*(7), 1597-1606. doi:10.1093/jac/dks121
238. **Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P.** (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *70*(1), 119-123.
239. **Poirel, L., Weldhagen, G. F., De Champs, C., & Nordmann, P.** (2002). A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*, *49*(3), 561-565. doi:10.1093/jac/49.3.561
240. **Polemis, M., Mandilara, G., Pappa, O., Argyropoulou, A., Perivolioti, E., Koudounakis, N., . . . Tryfinopoulou, K.** (2021). COVID-19 and Antimicrobial Resistance: Data from the Greek Electronic System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance-WHONET-Greece (January 2018-March 2021). *Life (Basel)*, *11*(10). doi:10.3390/life11100996
241. **Polemis, M., Tryfinopoulou, K., Giakkoupi, P., group, W. H.-G. s., & Vatopoulos, A.** (2020). Eight-year trends in the relative isolation frequency and antimicrobial susceptibility among bloodstream isolates from Greek hospitals: data from the Greek Electronic System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance - WHONET-Greece, 2010 to 2017. *Euro Surveill*, *25*(34), pii=1900516. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.34.1900516
242. **Poulou, A., Voulgari, E., Vrioni, G., Xidopoulos, G., Pliagkos, A., Chatzipantazi, V., . . . Tsakris, A.** (2012). Imported *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clones in a Greek hospital: impact of infection control measures for restraining their dissemination. *J Clin Microbiol*, *50*(8), 2618-2623. doi:10.1128/JCM.00459-12
243. **Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonmidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., . . . Tsakris, A.** (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*, *57*(3), 557-561. doi:10.1093/jac/dkl004

244. **Pournaras, S., Poulou, A., & Tsakris, A.** (2010). Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother*, *65*(7), 1319-1321. doi:10.1093/jac/dkq124
245. **Pournaras, S., Protonotariou, E., Voulgari, E., Kristo, I., Dimitroulia, E., Vitti, D., . . . Sofianou, D.** (2009). Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *64*(2), 348-352.
246. **Pray, L. A.** (2008). Transposons: The jumping genes. *Nature education*, *1*(1), 204.
247. **Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A.** (1999). *Microbiology* (4th ed.). New York: Mcgraw-Hill.
248. **Probst, K., Boutin, S., Späth, I., Scherrer, M., Henny, N., Sahin, D., . . . Nurjadi, D.** (2022). Direct-PCR from rectal swabs and environmental reservoirs: a fast and efficient alternative to detect blaOXA-48 carbapenemase genes in an *Enterobacter cloacae* outbreak setting. *Environmental Research*, *203*, 111808.
249. **Protonotariou, E., Poulou, A., Politi, L., Sgouropoulos, I., Metallidis, S., Kachrimanidou, M., . . . Skoura, L.** (2018). Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *Int J Antimicrob Agents*, *52*(3), 331-337.
250. **Queenan, A. M., & Bush, K.** (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, *20*(3), 440-458, table of contents. doi:10.1128/CMR.00001-07
251. **Queenan, A. M., Torres-Viera, C., Gold, H. S., Carmeli, Y., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Jr., . . . Bush, K.** (2000). SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, *44*(11), 3035-3039. doi:10.1128/aac.44.11.3035-3039.2000
252. **Raetz, C. R., & Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, *71*, 635-700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
253. **Rao, K., Micic, D., Chenoweth, E., Deng, L., Galecki, A. T., Ring, C., . . . Malani, P. N.** (2013). Poor functional status as a risk factor for severe *Clostridium difficile* infection in hospitalized older adults. *J Am Geriatr Soc*, *61*(10), 1738-1742. doi:10.1111/jgs.12442

254. **Rehman, M. S. U., Rashid, N., Ashfaq, M., Saif, A., Ahmad, N., & Han, J.-I.** (2015). Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries. *Chemosphere*, *138*, 1045-1055.
255. **Richter, S. N., Frasson, I., Biasolo, M. A., Bartolini, A., Cavallaro, A., & Palù, G.** (2012). Ultrarapid detection of bla KPC1/2-12 from perirectal and nasal swabs by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol*, *50*(5), 1718-1720.
256. **Richter, S. S., & Marchaim, D.** (2017). Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence*, *8*(4), 417-426. doi:10.1080/21505594.2016.1255381
257. **Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., . . . et al.** (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, *8*(2), 217-225. doi:10.1096/fasebj.8.2.8119492
258. **Rodriguez-Bano, J., & Pascual, A.** (2008). Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *6*(5), 671-683. doi:10.1586/14787210.6.5.671
259. **Rodriguez-Villodres, A., Martin-Gandul, C., Penalva, G., Guisado-Gil, A. B., Crespo-Rivas, J. C., Pachon-Ibanez, M. E., . . . Cisneros, J. M.** (2021). Prevalence and Risk Factors for Multidrug-Resistant Organisms Colonization in Long-Term Care Facilities Around the World: A Review. *Antibiotics (Basel)*, *10*(6). doi:10.3390/antibiotics10060680
260. **Russo, T. A., & Johnson, J. R.** (2018). Diseases Caused by Gram-Negative Enteric Bacilli. In J. L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
261. **Russo, T. A., & Marr, C. M.** (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*, *32*(3). doi:10.1128/cmr.00001-19
262. **Saidel-Odes, L., Polachek, H., Peled, N., Riesenber, K., Schlaeffer, F., Trabelsi, Y., . . . Codish, S.** (2012). 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. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *33*(1), 14-19.
263. **Samaha-Kfoury, J. N., & Araj, G. F.** (2003). Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*, *327*(7425), 1209-1213. doi:10.1136/bmj.327.7425.1209

264. **Samuelson, Ø., Naseer, U., Tofteland, S., Skutlaberg, D. H., Onken, A., Hjetland, R., . . . Giske, C. G.** (2009). Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, *63*(4), 654-658.
265. **Sanders, C. C., & Sanders Jr, W. E.** (1992).  $\beta$ -Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, *15*(5), 824-839.
266. **Schaberg, D. R., Culver, D. H., & Gaynes, R. P.** (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*, *91*(3b), 72s-75s. doi:10.1016/0002-9343(91)90346-y
267. **Schechner, V., Kotlovsky, T., Tarabeia, J., Kazma, M., Schwartz, D., Navon-Venezia, S., & Carmeli, Y.** (2011). Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) among patients with known CRE carriage at their next hospital encounter. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *32*(5), 497-503.
268. **Schwaber, M. J., & Carmeli, Y.** (2008). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA*, *300*(24), 2911-2913. doi:10.1001/jama.2008.896
269. **Schwaber, M. J., & Carmeli, Y.** (2014). An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*, *58*(5), 697-703. doi:10.1093/cid/cit795
270. **Schwaber, M. J., Klarfeld-Lidji, S., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Leavitt, A., & Carmeli, Y.** (2008). Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, *52*(3), 1028-1033. doi:10.1128/AAC.01020-07
271. **Schwaber, M. J., Lev, B., Israeli, A., Solter, E., Smollan, G., Rubinovitch, B., . . . Carmeli, Y.** (2011). Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clinical Infectious Diseases*, *52*(7), 848-855.
272. **Scoulica, E. V., Neonakis, I. K., Gikas, A. I., & Tselentis, Y. J.** (2004). Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *48*(3), 167-172.
273. **Segagni Lusignani, L., Presterl, E., Zatorska, B., Van den Nest, M., & Diab-Elschahawi, M.** (2020). Infection control and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing

- enterobacteriaceae. A 5 year (2011-2016) case-control study. *Antimicrob Resist Infect Control*, 9(1), 18. doi:10.1186/s13756-019-0668-2
274. **Shields, R. K., Chen, L., Cheng, S., Chavda, K. D., Press, E. G., Snyder, A., . . . Nguyen, M. H.** (2017). Emergence of ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne bla KPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(3), e02097-02016.
275. **Shon, A. S., Bajwa, R. P., & Russo, T. A.** (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107-118. doi:10.4161/viru.22718
276. **Simner, P. J., Goodman, K. E., Carroll, K. C., Harris, A. D., Han, J. H., & Tamma, P. D.** (2018). Using Patient Risk Factors to Identify Whether Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections Are Caused by Carbapenemase-Producing Organisms. *Open Forum Infect Dis*, 5(5), ofy094. doi:10.1093/ofid/ofy094
277. **Sjogren, R. E., & Gibson, M. J.** (1981). Bacterial survival in a dilute environment. *Appl Environ Microbiol*, 41(6), 1331-1336. doi:10.1128/aem.41.6.1331-1336.1981
278. **Skiada, A., Markogiannakis, A., Plachouras, D., & Daikos, G. L.** (2011). Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 37(3), 187-193.
279. **Skov, R. L., & Monnet, D. L.** (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9), 30155.
280. **Song, J. Y., & Jeong, I. S.** (2018). Development of a risk prediction model of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization among patients in intensive care units. *Am J Infect Control*, 46(11), 1240-1244. doi:10.1016/j.ajic.2018.05.001
281. **Southwick, F. S.** (2008). *Infectious diseases : a clinical short course* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Medical Pub. Div.
282. **Spyridopoulou, K., Psychogiou, M., Sypsa, V., Miriagou, V., Karapanou, A., Hadjihannas, L., . . . Daikos, G. L.** (2020). Containing Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an endemic setting. *Antimicrob Resist Infect Control*, 9(1), 102. doi:10.1186/s13756-020-00766-x

283. **Spyropoulou, A., Papadimitriou-Oliveris, M., Bartzavali, C., Vamvakopoulou, S., Marangos, M., Spiliopoulou, I., . . . Christofidou, M.** (2016). A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol*, *65*(3), 240-246. doi:10.1099/jmm.0.000217
284. **Strateva, T., & Yordanov, D.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, *58*(9), 1133-1148.
285. **Sullivan, L. M., Massaro, J. M., & D'Agostino, R. B., Sr.** (2004). Presentation of multivariate data for clinical use: The Framingham Study risk score functions. *Stat Med*, *23*(10), 1631-1660. doi:10.1002/sim.1742
286. **Sullivan, T., Ichikawa, O., Dudley, J., Li, L., & Aberg, J.** (2018). The Rapid Prediction of Carbapenem Resistance in Patients With *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Using Electronic Medical Record Data. *Open Forum Infect Dis*, *5*(5), ofy091. doi:10.1093/ofid/ofy091
287. **Swaminathan, M., Sharma, S., Poliansky Blash, S., Patel, G., Banach, D. B., Phillips, M., . . . Calfee, D. P.** (2013). Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the setting of endemicity. *Infect Control Hosp Epidemiol*, *34*(8), 809-817. doi:10.1086/671270
288. **Sypsa, V., Psychogiou, M., Bouzala, G. A., Hadjihannas, L., Hatzakis, A., & Daikos, G. L.** (2012). Transmission dynamics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and anticipated impact of infection control strategies in a surgical unit. *PLoS One*, *7*(7), e41068. doi:10.1371/journal.pone.0041068
289. **Tacconelli, E., Cataldo, M. A., Dancer, S. J., De Angelis, G., Falcone, M., Frank, U., . . . European Society of Clinical Microbiology.** (2014). 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*, *20 Suppl 1*, 1-55. doi:10.1111/1469-0691.12427
290. **Tacconelli, E., Mazzaferri, F., de Smet, A. M., Bragantini, D., Eggimann, P., Huttner, B. D., . . . Sanguinetti, M.** (2019). ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(7), 807-817.

291. **Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D., & Clancy, C.** (2020). Infectious Diseases Society of America antimicrobial resistant treatment guidance: gram-negative bacterial infections. *practice*, 6(8).
292. **Tamma, P. D., Opene, B. N., Gluck, A., Chambers, K. K., Carroll, K. C., & Simner, P. J.** (2017). Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 55(4), 1046-1055. doi:10.1128/JCM.02338-16
293. **Tängdén, T., & Giske, C.** (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of internal medicine*, 277(5), 501-512.
294. **Teixeira, J. V., Cecílio, P., Gonçalves, D., Vilar, V. J., Pinto, E., & Ferreira, H. N.** (2016). Multidrug-resistant Enterobacteriaceae from indoor air of an urban wastewater treatment plant. *Environ Monit Assess*, 188(7), 1-7.
295. **Teyseyre, L., Ferdynus, C., Miltgen, G., Lair, T., Aujoulat, T., Lugagne, N., . . . Allyn, J.** (2019). Derivation and validation of a simple score to predict the presence of bacteria requiring carbapenem treatment in ICU-acquired bloodstream infection and pneumonia: CarbaSCORE. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8, 78. doi:10.1186/s13756-019-0529-z
296. **the WHONET Study Group.** Incidence of bloodstream infections by bacterial species & type of ward per 10,000 patient days. Retrieved from <http://www.mednet.gr/whonet/>
297. **Thurlow, C. J., Prabaker, K., Lin, M. Y., Lolans, K., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., . . . Prevention Epicenters, P.** (2013). Anatomic sites of patient colonization and environmental contamination with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at long-term acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 34(1), 56-61. doi:10.1086/668783
298. **Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L.** (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(50), 20260-20264.
299. **Tischendorf, J., de Avila, R. A., & Safdar, N.** (2016). Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review. *Am J Infect Control*, 44(5), 539-543.
300. **Toussaint, A., & Merlin, C.** (2002). Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*, 47(1), 26-35.

301. **Tryfinopoulou, K., Giakkoupi, P., Pappa, O., Karadimas, K., Tsiodras, S., & Vatopoulos, A.** (2019). 631. *Laboratory Surveillance of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in an Endemic Country, Greece, 2015–2018*. Paper presented at the Open Forum Infect Dis.
302. **Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Markou, F., Ikonomidis, A., & Pournaras, S.** (2008). First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(6), 1257-1260.
303. **Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Themeli-Digalaki, K., Ikonomidis, A., Petropoulou, D., . . . Sofianou, D.** (2009). Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 47(2), 362-367.
304. **Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., . . . Sofianou, D.** (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 65(8), 1664-1671. doi:10.1093/jac/dkq210
305. **Tseng, W. P., Chen, Y. C., Yang, B. J., Chen, S. Y., Lin, J. J., Huang, Y. H., . . . Chen, S. Y.** (2017). Predicting Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Colonization and Associated Infection on Hospital Admission. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 38(10), 1216-1225. doi:10.1017/ice.2017.178
306. **Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., Bassetti, M., De Rosa, F. G., Spanu, T., Di Meco, E., . . . Cauda, R.** (2011). Identifying patients harboring extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* on hospital admission: derivation and validation of a scoring system. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7), 3485-3490. doi:10.1128/AAC.00009-11
307. **Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., Tumietto, F., Del Bono, V., De Rosa, F. G., Bassetti, M., . . . Viale, P.** (2014). Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(6), 3514-3520. doi:10.1128/AAC.02373-13
308. **Tumbarello, M., Viale, P., Viscoli, C., Trecarichi, E. M., Tumietto, F., Marchese, A., . . . Cristini, F.** (2012). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 55(7), 943-950.



309. **Tzanetou, K.** (2011). Interpretation of antibiogram, phenotypic tests and resistance mechanisms. *Acta Microbiologica Hellenica*, 56, 131-159.
310. **Tzouvelekis, L., Markogiannakis, A., Piperaki, E., Souli, M., & Daikos, G.** (2014). Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 862-872.
311. **Tzouvelekis, L. S., & Bonomo, R. A.** (1999). SHV-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*, 5(11), 847-864. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10539992>
312. **Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L.** (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 682-707. doi:10.1128/CMR.05035-11
313. **van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M.** (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*, 10(3), e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690
314. **van Duin, D., & Bonomo, R. A.** (2016). Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam: second-generation  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Infectious Diseases*, 63(2), 234-241.
315. **van Duin, D., Kaye, K. S., Neuner, E. A., & Bonomo, R. A.** (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 75(2), 115-120.
316. **Van Duin, D., Lok, J. J., Earley, M., Cober, E., Richter, S. S., Perez, F., . . . Doi, Y.** (2018). Colistin versus ceftazidime-avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 66(2), 163-171.
317. **van Loon, K., Voor In 't Holt, A. F., & Vos, M. C.** (2018). A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(1), e01730-01717. doi:10.1128/AAC.01730-17
318. **Vasoo, S., Barreto, J. N., & Tosh, P. K.** (2015). *Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician*. Paper presented at the Mayo clinic proceedings.
319. **Vasoo, S., Cunningham, S. A., Cole, N. C., Kohner, P. C., Menon, S. R., Krause, K. M., . . . Patel, R.** (2015). In vitro activities of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam, and a

panel of older and contemporary antimicrobial agents against carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(12), 7842-7846.

320. **Vasoo, S., Cunningham, S. A., Kohner, P. C., Simner, P. J., Mandrekar, J. N., Lolans, K., . . . Patel, R.** (2013). Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 51(9), 3097-3101. doi:10.1128/JCM.00965-13
321. **Vasudevan, A., Mukhopadhyay, A., Li, J., Yuen, E. G. Y., & Tambyah, P. A.** (2014). A prediction tool for nosocomial multi-drug resistant gram-negative bacilli infections in critically ill patients-prospective observational study. *BMC infectious diseases*, 14(1), 1-10.
322. **Vatopoulos, A.** (2008). High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill*, 13(4). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445397>
323. **Vera-Leiva, A., Barria-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Dominguez, M., . . . Gonzalez-Rocha, G.** (2017). [KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae]. *Rev Chilena Infectol*, 34(5), 476-484. doi:10.4067/S0716-10182017000500476
324. **Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., Quinn, J. P., & Colombian Nosocomial Resistance Study, G.** (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1553-1555. doi:10.1128/AAC.01405-06
325. **Voulgari, E., Zarkotou, O., Ranellou, K., Karageorgopoulos, D. E., Vriioni, G., Mamali, V., . . . Tsakris, A.** (2013). Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother*, 68(1), 84-88. doi:10.1093/jac/dks356
326. **Vourli, S., Tsorlini, H., Katsifa, H., Polemis, M., Tzouvelekis, L. S., Kontodimou, A., & Vatopoulos, A. C.** (2006). Emergence of *Proteus mirabilis* carrying the bla metallo-beta-lactamase gene. *Clin Microbiol Infect*, 12(7), 691-694. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01489.x
327. **Wadström, T., Aust-Kettis, A., Habte, D., Holmgren, J., Meeuwisse, G., Möllby, R., & Söderlind, O.** (1976). Enterotoxin-producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease. *Arch Dis Child*, 51(11), 865-870. doi:10.1136/adc.51.11.865

328. **Walsh, T. R., Bolmstrom, A., Qwarnstrom, A., & Gales, A.** (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol*, *40*(8), 2755-2759. doi:10.1128/jcm.40.8.2755-2759.2002
329. **Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P.** (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, *18*(2), 306-325. doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005
330. **Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A.** (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases*, *11*(5), 355-362.
331. **Wang, Y., Lin, Q., Chen, Z., Hou, H., Shen, N., Wang, Z., . . . Sun, Z.** (2021). Construction of a risk prediction model for subsequent bloodstream infection in intestinal carriers of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a retrospective study in hematology department and intensive care unit. *Infect Drug Resist*, *14*, 815.
332. **Wangchinda, W., Laohasakpravit, K., Lerdlamyong, K., & Thamlikitkul, V.** (2022). Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Infection and Colonization in Hospitalized Patients at a University Hospital in Thailand. *Infect Drug Resist*, *15*, 2199-2210.
333. **Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S.** (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *35*(1), 147-151. doi:10.1128/aac.35.1.147
334. **Wernli, D., Hausteil, T., Conly, J., Carmeli, Y., Kickbusch, I., & Harbarth, S.** (2011). A call for action: the application of The International Health Regulations to the global threat of antimicrobial resistance. *PLoS Med*, *8*(4), e1001022. doi:10.1371/journal.pmed.1001022
335. **Wiener-Well, Y., Rudensky, B., Yinnon, A. M., Kopuit, P., Schlesinger, Y., Broide, E., . . . Raveh, D.** (2010). Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect*, *74*(4), 344-349. doi:10.1016/j.jhin.2009.07.022
336. **Williams, P., Lambert, P. A., Brown, M. R., & Jones, R. J.** (1983). The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol*, *129*(7), 2181-2191. doi:10.1099/00221287-129-7-2181
337. **Woodford, N., Tierno, P. M., Jr., Young, K., Tysall, L., Palepou, M. F., Ward, E., . . . Livermore, D. M.** (2004). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-

- hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4793-4799. doi:10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004
338. **Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B., & Farrar, J.** (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140083.
339. **World Health Organization.** (2017). *Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities*. Geneva: World Health Organization.
340. **World Health Organization.** (2019). *Implementation manual to prevent and control the spread of carbapenem-resistant organisms at the national and health care facility level: interim practical manual supporting implementation of the Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities*. Retrieved from Geneva: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312226>
341. **World Health Organization.** (2020). Global health estimates 2020: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2019. *Geneva: World Health Organization*.
342. **Wormser, G. P., & Hanna, B. A.** (2004). Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. Edited by Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, and Robert H. Tenover Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, 2003. 2322 pp. \$189.95 (cloth). *Clinical Infectious Diseases*, 38(8), 1199-1200. doi:10.1086/383067
343. **Wright, H., Bonomo, R. A., & Paterson, D. L.** (2017). New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? *Clin Microbiol Infect*, 23(10), 704-712. doi:10.1016/j.cmi.2017.09.001
344. **Wu, D., Cai, J., & Liu, J.** (2011). Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *South Med J*, 104(2), 106-110. doi:10.1097/SMJ.0b013e318206063d
345. **Wu, M.-C., Lin, T.-L., Hsieh, P.-F., Yang, H.-C., & Wang, J.-T.** (2011). Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PLoS One*, 6(8), e23500.
346. **Yamaguchi, A., Nakashima, R., & Sakurai, K.** (2015). Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol*, 6, 327.

347. **Yang, D., Xie, Z., Xin, X., Xue, W., & Zhang, M.** (2016). A model for predicting nosocomial carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Biomed Rep*, 5(4), 501-505. doi:10.3892/br.2016.752
348. **Yang, P., Chen, Y., Jiang, S., Shen, P., Lu, X., & Xiao, Y.** (2018). Association between antibiotic consumption and the rate of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria from China based on 153 tertiary hospitals data in 2014. *Antimicrob Resist Infect Control*, 7, 137. doi:10.1186/s13756-018-0430-1
349. **Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., . . . Tenover, F. C.** (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4), 1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
350. **Yong, D., Lee, K., Yum, J. H., Shin, H. B., Rossolini, G. M., & Chong, Y.** (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*, 40(10), 3798-3801. doi:10.1128/jcm.40.10.3798-3801.2002
351. **Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R.** (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(12), 5046-5054. doi:10.1128/AAC.00774-09
352. **Yu, F., Lv, J., Niu, S., Du, H., Tang, Y.-W., Bonomo, R. A., . . . Chen, L.** (2018). In vitro activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(8), e01031-01018.
353. **Zimmerman, F. S., Assous, M. V., Bdolah-Abram, T., Lachish, T., Yinnon, A. M., & Wiener-Well, Y.** (2013). Duration of carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae following hospital discharge. *Am J Infect Control*, 41(3), 190-194. doi:10.1016/j.ajic.2012.09.020
354. **Αρσένη, Α.** (1994a). Enterobacteriaceae I. In *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων* (4η ed., Vol. I, pp. 233-276). Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα.
355. **Αρσένη, Α.** (1994b). Enterobacteriaceae II. In *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων* (4 ed., Vol. I, pp. 276-309). Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα.

356. **Αρσένη, Α.** (1994c). Enterobacteriaceae III. In *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων* (4 ed., Vol. I, pp. 309-356). Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα.
357. **Γερμενής, Α. Ε.** (2000). *Ιατρική Ανοσολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.
358. **Γριβάκου, Ε.** (2018). *Διερεύνηση μεθόδων φαινοτυπικού ελέγχου για ανίχνευση εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών στα gram-αρνητικά βακτήρια*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
359. **Ιωσηφίδης, Η.** (2013). *Συσχέτιση της κατανάλωσης αντιμικροβιακών φαρμάκων και μικροβιακής αντοχής σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο. Μελέτη της επίδρασης θεραπευτικών οδηγιών παρέμβασης*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
360. **Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ).** (2015). *Οδηγίες για τον έλεγχο της διασποράς των πολυανθεκτικών παθογόνων σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας* (Φ. Κοντοπίδου & Γ. Α. Δαΐκος Eds.). Αθήνα: ΚΕΕΛΠΝΟ.
361. **Κουπίδου, Γ.** (2019). *Αντοχή της Klebsiella pneumoniae στα αντιβιοτικά*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή επιστημών υγείας, Ιατρικό τμήμα, Ιωάννινα. olymprias.lib.uoi.gr.
362. **Παναγιωτακοπούλου, Α. Κ.** (2013). *In vitro και in vivo μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσεως των καρβαπενεμών έναντι εντεροβακτηριακών που παράγουν μεταλλοένζυμα της ομάδας VIM*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
363. **Σπυριδοπούλου, Κ. Π.** (2020). *Μελέτη της δυναμικής διασποράς ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Klebsiella pneumoniae σε ασθενείς νοσηλεύομενους σε αιματολογική κλινική*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
364. **Τρυφίνοπούλου, Κ.** (2013). *Πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά Gram-αρνητικά βακτηρίδια: παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης νοσοκομειακής λοίμωξης και επίδραση στην έκβασή της. Αναζήτηση της μοριακής βάσης της πολυαντοχής-ο ρόλος των integrons*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Αθήνα. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
365. **Χατζηδημητρίου, Μ. Α.** (2006). *Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής εντεροβακτηριακών στην τριμεθοπρίμη*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ιατρική Σχολή, Θεσσαλονίκη. Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.

