



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

——— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ———

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μηχανισμοί αντοχής στον αναστολέα
καρβαπενεμασών anibactam»**

ΜΑΡΙΑ Θ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ, ΕΙΔΙΚΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΤΣΑΚΡΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΠΙΤΥΡΙΓΚΑ ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΔΗΜΗΤΡΟΥΛΙΑ ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους όσοι βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Αρχικά την τριμελή μου επιτροπή: τον Καθηγητή κύριο Αθανάσιο Τσακρή για την επιστημονική εποπτεία του πονήματος καθώς και για την εμπιστοσύνη του στην ανάθεση του θέματος. Την κυρία Βασιλική Πιτυρίγκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, για την πολύτιμη καθοδήγηση της, την επιστημονική ανατροφοδότηση και την προθυμία σε κάθε φάση της εκπόνησης. Την Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Ευαγγελία Δημητρούλια για την άριστη συνεργασία και σημαντική αρωγή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους συναδέλφους στο χώρο εργασίας μου για την υπομονή και την πολύτιμη υποστήριξη.

Η εργασία είναι αφιερωμένη στη μητέρα μου Α. Κάρλε τ. Συντονίστρια Διευθύντρια Τμήματος Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας Τζανείου Γενικού Νοσοκομείου Πειραιά και στη θεία μου Π. Κάρλε τ. Συντονίστρια Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Τμήματος Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας Πειραιά για την αγάπη που μου εμφύσησαν αμφότερες για την επιστήμη της Ιατρικής Βιοπαθολογίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Avibactam είναι ένας νέος αναστολέας β-λακταμάσης που χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με την Ceftazidime για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά βακτήρια. Παρά το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι αποτελεσματικός έναντι πολλών βακτηριακών στελεχών, ορισμένα έχουν ήδη αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής. Υπάρχουν διάφοροι γνωστοί μηχανισμοί αντοχής στην Avibactam. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως σε δύο κατηγορίες. Στους ενζυματικούς και στους μη ενζυματικούς.

Ενζυματικοί μηχανισμοί:

1. Παραγωγή ενζύμων υδρόλυσης της Avibactam: Τα βακτήρια μπορούν να παράγουν ένζυμα β-λακταμάσης που στοχεύουν ειδικά και αποδοθούν τον αναστολέα καθιστώντας τον αναποτελεσματικό. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι για παράδειγμα η καρβαπενεμάση KPC-2 που παράγεται από ορισμένα στελέχη *K. pneumoniae*. Το ένζυμο υδρολύει την Avibactam όπως και τις καρβαπενέμες, καθιστώντας αυτά τα αντιβιοτικά αναποτελεσματικά.

2. Επαγωγή της λειτουργίας άλλων β-λακταμασών: Τα βακτήρια μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή άλλων ενζύμων όπως των εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών, τα οποία δεν επηρεάζονται από τη δράση της Avibactam. Αυτό επιτρέπει στα στελέχη να συνεχίζουν να υδρολύουν τα αντιβιοτικά προκαλώντας αντοχή. Για παράδειγμα κάποια στελέχη *Enterobacter cloacae* επάγουν την παραγωγή ESBL, καθιστώντας την Avibactam λιγότερο αποτελεσματική.

Μη ενζυματικοί μηχανισμοί:

1. Αλλαγή στη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη: Τα βακτήρια μπορούν να τροποποιήσουν τις κυτταρικές τους μεμβράνες για να αποτρέψουν την είσοδο της Avibactam στο κύτταρο, γεγονός που μειώνει την αποτελεσματικότητά της. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί αλλάζοντας την έκφραση της εξωτερικής μεμβράνης και εισχωρώντας στον περιπλαστικό χώρο όπου βρίσκονται τα ένζυμα της β-λακταμάσης. Αυτός ο μηχανισμός έχει περιγραφεί σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Αντλίες εκροής: Τα βακτήρια μπορεί να χρησιμοποιήσουν αντλίες εκροής για να αντλήσουν την Avibactam από το εσωτερικό του κυττάρου, εμποδίζοντάς τη να φτάσει στο στόχο της. Ο μηχανισμός έχει περιγραφεί σε στελέχη *Enterobacter cloacae*, όπου η Avibactam εκρέει ενεργά έξω από το κύτταρο μέσω ενός συγκεκριμένου συστήματος αντλίας εκροής.

Συνοπτικά η αντοχή στην Avibactam μπορεί να επιτευχθεί μέσω πολλαπλών μοριακών μηχανισμών. Η κατανόηση αυτών είναι σημαντική προκειμένου να αποφευχθεί η εξάπλωσή τους και να διασωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο αυτός ο νέος αντιμικροβιακός παράγοντας.

Λέξεις κλειδιά: μηχανισμοί αντοχής, αναστολέας β-λακταμάσης, αβιμπακτάμη, πολυανθεκτικά βακτήρια

ABSTRACT

Avibactam is a beta-lactamase inhibitor that is often used in combination with Ceftazidime to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria. While avibactam is effective against many strains of bacteria, some have already developed resistance mechanisms to this drug. There are several known molecular resistance mechanisms of resistance to avibactam. The molecular mechanisms of resistance to avibactam can be broadly classified into two categories: enzymatic and non-enzymatic mechanisms.

Enzymatic mechanisms:

1. Production of avibactam-hydrolyzing enzymes: Bacteria can produce β -lactamase enzymes that specifically target and degrade avibactam, rendering it ineffective. One such enzyme is for example the KPC-2 carbapenemase produced by some *K. pneumoniae* strains. KPC-2 hydrolyzes avibactam and carbapenems, making these antibiotics ineffective.

2. Upregulation of other β -lactamase enzymes: Bacteria may increase the production of other β -lactamase enzymes, such as extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), which are not affected by avibactam. This allows the bacteria to continue to break down antibiotics and cause infection. For example some *Enterobacter cloacae* strains can upregulate ESBLs, making avibactam less effective.

Non-enzymatic mechanisms:

1. Changes in bacterial cell membranes: Bacteria may modify their cell membranes to prevent avibactam from entering the cell, which reduces its effectiveness. This can be achieved by altering the expression of outer membrane and entering the periplasmic space where the β -lactamase enzymes are located. This mechanism has been reported in some strains of *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Efflux pumps: Bacteria may use efflux pumps to pump out avibactam from within the cell, preventing it from reaching its target. This mechanism has been reported for example in some strains of *Enterobacter cloacae*, where avibactam is actively effluxed out of the cell by a specific efflux pump system.

In summary, resistance to avibactam can occur through multiple molecular mechanisms. Understanding these mechanisms is important in order to avoid their spread and to save as much as possible this new antimicrobial agent.

Keywords: resistance mechanisms, β -lactamase inhibitor, avibactam, multidrug resistant bacteria

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	5
Περιεχόμενα	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	11
A. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ	11
B. ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ (IMPERMEABILITY)	21
C. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΤΛΙΑΣ ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ.....	22
D. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΔΡΑΣΗΣ	23
3. ΠΑΛΑΙΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	24
4. ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	26
A. ΑΝΙΒΑΣΤΑΜ (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: CEFTAZIDIME/ANIVASTAM)	26

B.	RELEBACTAM (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: IMIPENEM/RELEBACTAM).....	28
C.	ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΒΟΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	29
D.	VABORBACTAM (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: MEROPENEM/VABORBACTAM).....	30
E.	Άλλοι νέοι αναστολείς:	31
5.	Κλινική χρήση του συνδυασμού CEFTAZIDIME/AVIBACTAM (CAZ/AVI)	33
6.	Μηχανισμοί αντοχής στο νέο αναστολέα AVIBACTAM	35
A.	Παραλλαγές β-λακταμάσης.....	37
I.	Μεταβολές στα ένζυμα KPC.....	37
II.	Μεταλλάξεις AMPC.....	39
III.	Μεταλλάξεις BLA-OXA	39
IV.	Αντοχή από άλλες, σπανιότερες παραλλαγές β-λακταμάσης.....	39
B.	Αντοχή στο συνδυασμό CAZ/AVI που σχετίζεται με αλλαγές στη διαπερατότητα της βακτηριακής μεμβράνης	40
C.	Αντοχή στο συνδυασμό CAZ/AVI που σχετίζεται με αντία έκροση.....	40
D.	Μηχανισμός αντοχής στο CAZ/AVI που προκαλούνται από παραλλαγές των PBPs.	41
7.	Μέθοδοι ανίχνευσης της αντοχής στο CAZ/AVI.....	42
8.	Παγκόσμια επιδημιολογία ανθεκτικών στελεχών στο CAZ/AVI	45
9.	Συμπεράσματα	49
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα πολυανθεκτικά gram (-) βακτήρια, αποτελούν τεράστια πρόκληση ως προς την αντιμετώπισή τους για την παγκόσμια ιατρική κοινότητα λόγω των μηχανισμών αντοχής που έχουν αναπτύξει έναντι των περισσότερων ομάδων αντιβιοτικών. Οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές για τις ανθεκτικές στα αντιβιοτικά λοιμώξεις, γίνονται ολοένα και λιγότερο αποτελεσματικές οδηγώντας σε θεραπευτικές αποτυχίες, αυξάνοντας το κόστος θεραπείας και θέτοντας σε κίνδυνο τη ζωή των ασθενών. Η μικροβιακή αντοχή και ειδικότερα η αντοχή των gram (-) στις καρβαπενέμες αποτελεί πρόκληση στην αντιμετώπισή της.

Οι β-λακτάμες είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ομάδα αντιβιοτικών στην κλινική πράξη. Περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες ουσιών με κοινό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός β-λακταμικού δακτυλίου στο μόριό τους. Μέλη αυτής της ομάδας είναι οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι κεφαμυκίνες, οι καρβαπενέμες, οι μονοβακτάμες και οι αναστολείς των β-λακταμασών. Από τις β-λακτάμες, οι καρβαπενέμες διαφέρουν δομικά από τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες ενώ έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης και σταθερότητας έναντι ενζύμων που υδρολύουν τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

Οι παλαιοί αναστολείς είναι ημισυνθετικά παράγωγα στρεπτομυκήτων και έχουν μικρή αντιμικροβιακή δράση. Όταν όμως συγχρηγηθούν με ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό δρουν συνεργικά, αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων που λύνουν το β-λακταμικό αντιβιοτικό, προστατεύοντάς το. Οι παλαιότεροι αναστολείς όπως το κλαβουλανικό, η σουλμπακτάμη, η ταζομπακτάμη κ.α. συνδυάζονται με πενικιλίνες (αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη, τικαρκιλίνη, πιπερακιλλίνη).

Η Ceftazidime/Avibactam (CAZ/AVI) είναι ένας νέος αντιμικροβιακός παράγοντας του οποίου ο συνδυασμός έχει καλή δραστικότητα έναντι των gram (-) βακτηρίων, κυρίως των εντεροβακτηριακών. Στο συγκεκριμένο συνδυασμό συνυπάρχει ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό της ομάδας της τρίτης γενιάς κεφαλοσπορινών (Ceftazidime: CAZ) και ο νέος αναστολέας (Avibactam: AVI). Ωστόσο και παρά το γεγονός ότι η χρήση του αριθμεί λίγα χρόνια κυκλοφορίας, ήδη εμφανίζονται περιπτώσεις αντοχής σε αυτόν. Αυτό οφείλεται κυρίως σε πολλαπλά ένζυμα τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στα μικρόβια είτε σε χρωμοσώματα είτε σε πλασμίδια. Αυτά είναι μεταθετά γενετικά στοιχεία με αποτέλεσμα να διαχέονται στα παθογόνα, προστατεύοντάς τα από τη δράση των αντιμικροβιακών ενώ η διασπορά τους πλέον είναι παγκόσμια. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται β-λακταμάσες. Υπάρχουν αρκετά είδη β-λακταμασών με παρόμοια λειτουργία. Γνωρίζουμε ήδη από τη βιβλιογραφία, την εύχρηστη ταξινόμηση των ενζύμων αυτών σε κατηγορίες/τάξεις ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους (μοριακή δομή). Φυσικά υπάρχουν και άλλων ειδών ταξινομήσεις όπου τα ένζυμα κατατάσσονται ανάλογα με τη λειτουργικότητά τους.

Η ανάπτυξη βακτηριακής αντοχής είναι πάντα απότοκο της χρήσης των αντιβιοτικών. Έτσι σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη χρήση του παρατηρείται παγκόσμια καταγραφή ανθεκτικών στελεχών και στο συνδυασμό CAZ/AVI. Ο μόνος τρόπος για να αντιμετωπιστεί αυτή πραγματικότητα, είναι η μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών αντοχής προκειμένου να σχεδιαστούν νέες στρατηγικές δράσης. Σε αυτό το πόνημα, αρωγός είναι η εξέλιξη της βιοτεχνολογίας και η κατανόηση σε μοριακό επίπεδο των μηχανισμών. Αντικείμενο με το οποίο ασχολείται εις βάθος η επιστήμη της Μοριακής Βιοπαθολογίας. Στην παρούσα μελέτη, θα γίνει μια αποτύπωση των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά και ανάλυση κυρίως των μηχανισμών αντοχής οι οποίοι έχουν ήδη αποτελέσει αντικείμενο προβληματισμού σε σχέση με τη χρήση του νέου αναστολέα Avibactam.

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

Η αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά χωρίζεται σε φυσική (ή ενδογενή) και επίκτητη. Εδώ μας ενδιαφέρει και θα αναλυθεί η επίκτητη αντοχή. Η επίκτητη αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά είναι αποτέλεσμα είτε σημειακών μεταλλάξεων του χρωμοσωμικού DNA ή/και αποτέλεσμα οριζόντιας μεταβίβασης γενετικού υλικού (γονιδίων αντοχής) από άλλα βακτήρια με διάφορους τρόπους όπως μεταμόρφωση (transformation), σύζευξη (conjugation) και μεταγωγή (transduction). Η επίκτητη αντοχή είναι το λαμπρότερο παράδειγμα ταχείας προσαρμογής των ειδών λόγω της εξελικτικής πίεσης που επικρατεί στο νέο οικοσύστημα. Οι μηχανισμοί στους οποίους θα αναφερθούμε στην εν λόγω μελέτη, είναι αυτοί της αντοχής των gram (-) βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά δηλαδή η παραγωγή β-λακταμασών, η μειωμένη διαπερατότητα που οφείλεται στην απώλεια των πορινών, τα συστήματα αντλίας ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού και η τροποποίηση του στόχου δράσης – PBPs. Ανάλογα με το μηχανισμό το βακτήριο γίνεται πολυανθεκτικό ή πανανθεκτικό.

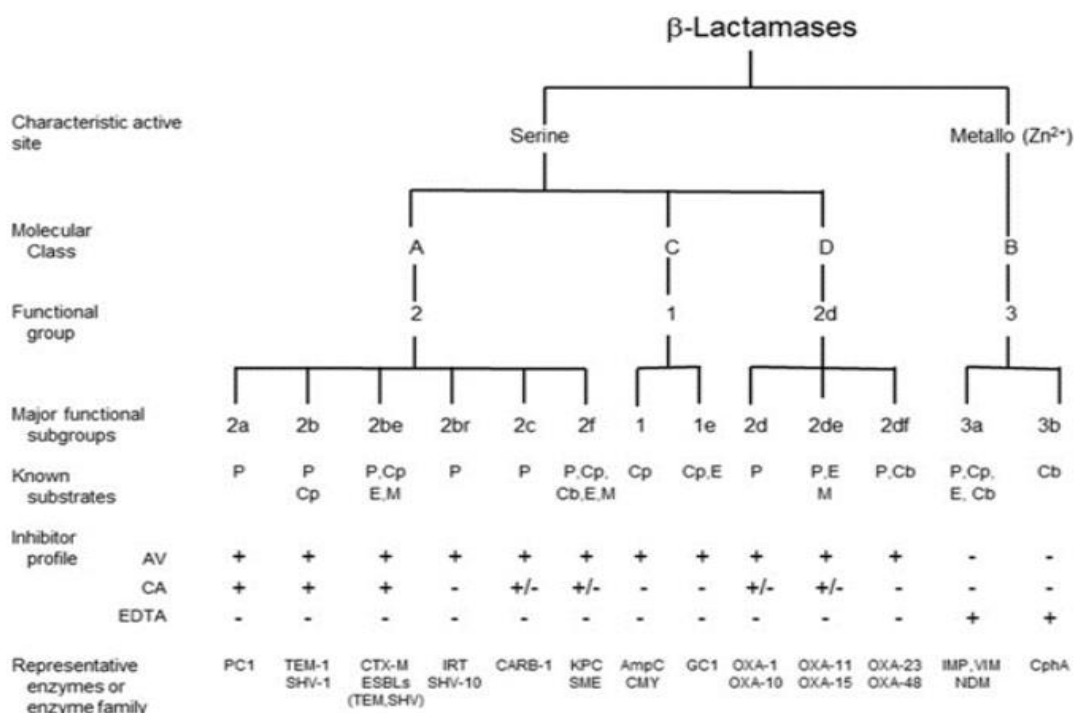
a. ΠΑΡΑΓΩΓΗ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Πρόκειται για τον κυριότερο μηχανισμό αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η ταξινόμηση των β-λακταμασών μπορεί να γίνει βάση της λειτουργικότητας (ταξινόμηση κατά Bush-Jacoby-Medeiros¹), που ωστόσο στην πράξη δε χρησιμοποιείται. Πιο συχνή και εύχρηστη είναι η μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler². Η ταξινόμηση κατά Ambler πραγματοποιείται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων των β-λακταμασών και τις χωρίζει σε τέσσερις τάξεις: A, B, C, D. Επίσης διακρίνονται από θεμελιώδεις διαφορές στον μηχανισμό υδρόλυσης. Όσον αφορά στις τρεις τάξεις A, C και D, ο μηχανισμός αντοχής

βασίζεται στη δράση της σερίνης (serine β -lactamases αναφερόμενες ως: SBLs)³. Η τάξη B περιλαμβάνει μία ετερογενή ομάδα μεταλλο- β -λακταμασών (metallo- β -lactamases, γνωστές ως MBLs) η οποία στηρίζει τη δράση της στα ιόντα ψευδαργύρου (Zn)³. Και οι τέσσερις κατηγορίες ενζύμων είναι ευρέως κατανεμημένες σε πολλά είδη βακτηρίων. Ωστόσο κάποιες οικογένειες έχουν διαδοθεί εντυπωσιακά στα πιο κλινικά σημαντικά παθογόνα. Αυτά είναι κυρίως κάποια gram (-) βακτήρια τα οποία σχετίζονται με νοσοκομειακές λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων των *Εντεροβακτηριακών* όπως *E.coli*, *K. pneumoniae* και αζυμωτικά βακτηρίδια όπως η *P. aeruginosa* και το *A. baumannii*.³

Παρά το γεγονός ότι οι τρεις κατηγορίες SBLs διαφέρουν ουσιαστικά ως προς την αλληλουχία τους, όλες χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό ακυλίωσης-αποακυλίωσης, ο οποίος θυμίζει αυτόν των πρωτεασών της σερίνης κατά τον οποίο η πυρηνόφιλη σερίνη ενεργοποιείται από μια βάση, προσβάλλει τον άνθρακα καρβονυλίου και δημιουργεί ένα ενδιάμεσο ακυλένζυμο. Οι τρεις κατηγορίες κατά Ambler διαφέρουν ωστόσο μηχανιστικά, ιδίως όσον αφορά στις ακριβείς αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται.³

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, οι β -λακταμάσες έχουν ταξινομηθεί βιοχημικά σε 2 ευρείες υποδιαίρεσεις ανάλογα με το μηχανισμό με τον οποίο εκτελούν την υδρόλυση, είτε μέσω της δράσης της σερίνης είτε μέσω των ιόντων ψευδαργύρου. Αφού έγιναν διαθέσιμες οι αλληλουχίες του γονιδιώματος για τις βασικές β -λακταμάσες, καταλήξαμε σε τέσσερις μοριακές κατηγορίες A, B, C, και D με βάση το μοριακό μέγεθος και την ομολογία μεταξύ των μοτίβων της ενεργής θέσης. Ωστόσο οι βιοχημικές διαφορές μεταξύ πενικιλινασών και κεφαλοσπορινασών είχαν αναγνωριστεί πολύ πιο πριν με αποτέλεσμα να διακρίνουμε τις β -λακταμάσες βάσει λειτουργικών ικανοτήτων που σχετίζονται με τα προφίλ υποστρώματος και αναστολέα. Σήμερα υπάρχουν τουλάχιστον 17 λειτουργικές ομάδες που σχετίζονται με τις 4 μοριακές κατηγορίες, με τις κύριες ομάδες να φαίνονται στην εικόνα 1. Τα ένζυμα εξακολουθούν να διαφοροποιούνται σε σχέση με τη σχετική υδρόλυση των υποστρωμάτων της β -λακτάμης, των πενικιλινών, των κεφαλοσπορινών, των καρβαπενεμών και μονοβακτάμης. Περαιτέρω διαφοροποίηση είναι δυνατή με βάση τις αντιδράσεις με το κλαβουλανικό οξύ, τον αναστολέα ευρέως φάσματος αβιμπακτάμη και το EDTA⁴.



Εικόνα 1: Ταξινόμηση των β-λακταμασών με βάση τη μοριακή και λειτουργική δομή τους. (AV: Avibactam, CA: Clavoulanic Acid, Cp: Cephalosporin, E: Extended Spectrum Cephalosporin, M: Monobactam, P: Penicillin)⁴

Τάξη A κατά Ambler: Στη συγκεκριμένη ομάδα ανήκουν οι εξής β-λακταμάσες που θα αναλυθούν παρακάτω: TEM, SHV, ESBL, KPC, CTX, IRTs (Inhibitor Resistant TEMs), IRSs (Inhibitor Resistant SHVs)⁵.

TEM (TEMONEIRA) β-λακταμάσες: Οι TEM β-λακταμάσες είναι οι εκτενέστερα μελετημένες β-λακταμάσες ανάμεσα στα μελετημένα ένζυμα που προκαλούν υδρόλυση στο β-λακταμικό δακτύλιο των πενικιλινών, κεφαλοσπορινών και σχετικών αντιβιοτικών τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως και βρίσκονται σε μεγάλη συχνότητα στο νοσοκομειακό περιβάλλον ανά τον κόσμο⁶. Έχουν περιγραφεί άνω των 174 παραλλαγών του ενζύμου και συνέχεια εμφανίζονται νέες⁶. Όλες οι παραλλαγές TEM διαφέρουν ως προς την αλληλουχία αμινοξέων και πολλές από αυτές διαφέρουν ως προς τον φαινότυπο αντοχής που προσδίδουν σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Η TEM-1 αποτελεί την πιο συχνή παραλλαγή και μάλιστα απομονώθηκε το 1963 στην Ελλάδα⁷. Η TEM-1 προσδίδει αντοχή μόνο έναντι των πενικιλινών και έναντι της πρώτης γενιάς κεφαλοσπορινών. Σε αυτό το ένζυμο οφείλεται η >90% αντοχή του *E.coli* στην αμικικιλίνη⁵. Αν για παράδειγμα υπάρχει ένα υπό μελέτη

στέλεχος *E. coli* με παραγωγή TEM-β λακταμάσης θα παρατηρηθεί στο αντιβιογράμμα αντοχή στις πενικιλίνες, ενώ με την προσθήκη αναστολέα θα παρατηρηθεί ευαισθησία. Αυτό φυσικά είναι μια υπόθεση που εξάγεται φαινοτυπικά. Για να αποδειχθεί κάτι τέτοιο χρειάζεται μοριακή ανάλυση (PCR)⁵. Για να κατανοηθεί πώς μία συγκεκριμένη υποκατάσταση ενός αμινοξέος μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή των καταλυτικών παραμέτρων και του φαινοτύπου αντοχής του TEM-1, χρειάζονται δομικές πληροφορίες του μορίου. Με την πάροδο των ετών οι τριτοταγείς δομές πολλών παραλλαγών των TEM, έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και έχουν δημοσιευτεί αρκετές ανασκοπήσεις σχετικά με τη δομική εικόνα των αντικαταστάσεων που συναντώνται συχνά στην TEM-1⁸. Το φάσμα αντοχής των επόμενων γενεών ενζύμων εξαπλώνεται και περιλαμβάνει αντοχή και έναντι των κεφαλοσπορινών δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς, μονοβακτάμες και αναστολείς β-λακταμάσης⁶. Επί παραδείγματι η ύπαρξη προσαρμοστικών υποκαταστάσεων άλλων αμινοξέων από άλλα, οδήγησαν σε παραλλαγές ενζύμων M182T και S268G που προκαλούν φαινότυπο αντοχής τόσο στα β-λακταμικά όσο και στο συνδυασμό με αναστολέα⁶. Παρά το γεγονός ότι η ύπαρξη άνω των 174 TEMs οφείλεται στην παραλλαγή ενός διαφορετικού κάθε φορά αμινοξέος καινούριες TEMs συνεχίζουν να εμφανίζονται. Η συνεχής αυτή εμφάνιση νέων αλληλομόρφων υποδηλώνει ότι το εξελικτικό δυναμικό των TEMs δεν έχει διερευνηθεί πλήρως σε όλα τα σχετιζόμενα με κλινικά δείγματα βακτήρια. Νέοι φαινότυποι αναμένεται να εμφανίζονται συνεχώς οδηγώντας σε θεραπευτικές αποτυχίες⁶.

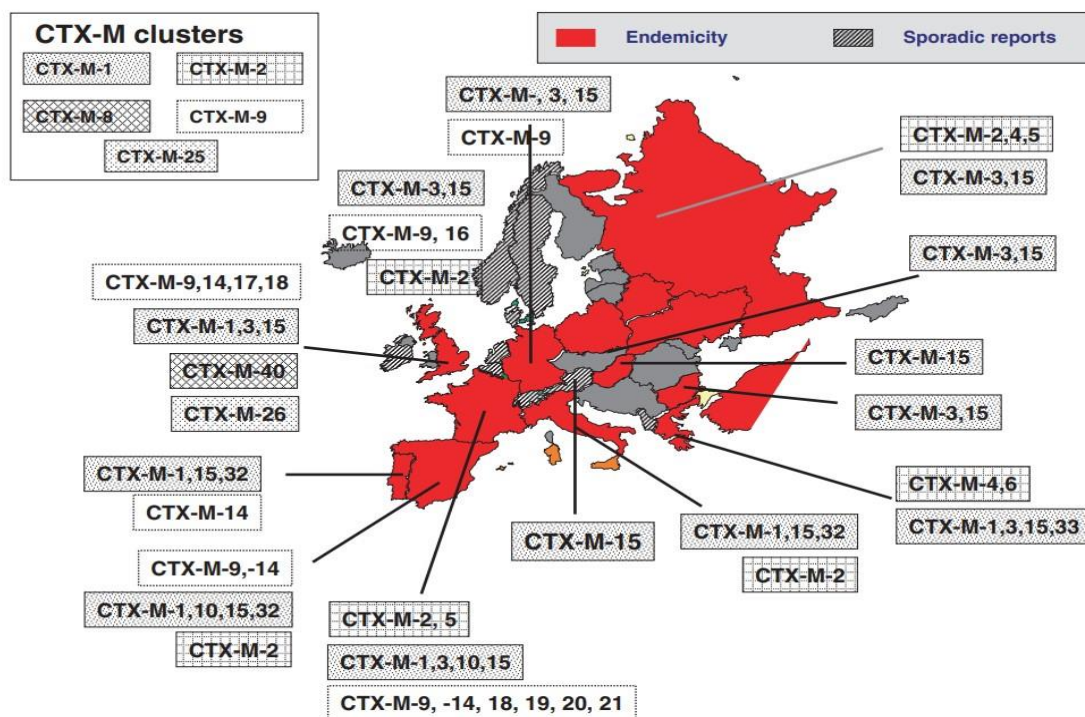
SHV β-λακταμάσες: Οι SHV μαζί με τις TEM είναι μέλη της ίδιας τάξης των β-λακταμασών (Τάξη A), η οποία περιγράφει τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργία του wild-type της επικρατούσης πενικιλινάσης. Παρά το γεγονός ότι οι ενεργείς θέσεις των ενζύμων είναι παρόμοιες και μοιράζονται τις ίδιες αλληλουχίες σε ποσοστό 68%, υπάρχουν αρκετές διαφορές στα ένζυμα που επηρεάζουν την εξέλιξή τους⁹. Η SHV είναι η β-λακταμάση που έχει εξαπλωθεί μέσω πλασμιδίων σε όλα σχεδόν τα εντεροβακτηριακά⁹ αλλά συναντάται κυρίως στο μηχανισμό αντοχής της *Klebsiella* στην αμπικιλίνη^{5,9}. Αναστολή της SHV γίνεται με προσθήκη αναστολέα in vitro και in vivo⁵. Από όλες τις SHV που υπάρχουν (άνω των 60), υπάρχει μία η οποία για να ανασταλεί, απαιτεί μέγιστη συγκέντρωση του αναστολέα. Αυτή είναι η SHV-1⁵. Για αυτό το λόγο όταν ελέγχεται κλασικά φαινοτυπικά παρατηρείται αντοχή στο συνδυασμό αμοξυκιλίνη/κλαβουλανικό, ενώ στο αντιβιογράμμα που δίνει το ημιαυτοματοποιημένο μηχάνημα εμφανίζεται η παρατήρηση πιθανός φαινότυπος υπερπαραγωγής SHV-1⁵.

ESBLs (Extended Spectrum beta-lactamases): Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, είναι γνωστές παγκοσμίως από τα τέλη της δεκαετίας του 1980¹⁰. Πρόκειται για

ένζυμα πλασμιδιακά καθοριζόμενα. Ανήκουν στην τάξη A σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Ambler και στην τάξη 2be σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Bush. Εμφανίζονται κυρίως στην *E. coli* και την *Klebsiella*^{5,10} αλλά και σε λοιπά εντεροβακτηριακά, ενώ πιο σπάνια μπορεί να εμφανιστούν σε αζυμωτικά βακτήρια όπως η *Pseudomonas* και το *Acinetobacter*⁵. Οι ασθενείς με τέτοια στελέχη, μπορεί να οδηγηθούν σε θεραπευτική αποτυχία. Τα παθογόνα που παράγουν ESBLs υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο και ως εκ τούτου είναι ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης}, 4^{ης} γενιάς (εξαιρέση αποτελεί η κεφοξιτίνη που ανήκει στις κεφαμυκίνες), στις πενικιλίνες και στις μονοβακτάμες⁵. Με προσθήκη αναστολέα έχει παρατηρηθεί ενδεχόμενη ευαισθησία μόνο in vitro εκτός από περιπτώσεις που αφορούν σε ουρολοιμώξεις. Αυτό συμβαίνει γιατί στα ούρα μπορούν αν επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον πολλά στελέχη *E. coli* και την *Klebsiella* εμφανίζουν αντοχή και σε άλλα αντιμικροβιακά όπως οι φθοριοκινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες και οι τετρακυκλίνες¹¹. Φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν ESBLs αποτελούν οι καρβαπενέμες. Ο επιπολασμός των ESBLs στην Ευρώπη είναι υψηλότερος από ό,τι στις ΗΠΑ, αλλά χαμηλότερος από ό,τι στην Ασία και τη Νότια Αμερική. Ωστόσο έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών.¹²

Τύποι ESBLs: GES, PER, VEB είναι ευρέως φάσματος με δράση κυρίως έναντι της Ceftazidime (κεφταζιδιμάσες)⁵.

Επίσης ο τύπος CTX-M είναι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάση με δράση κυρίως κατά της Cefotaxime⁴. Ο τύπος CTX-M σχετίζεται με χρωμοσωμιακές β-λακταμάσες του γένους *Kluyvera*. Σήμερα είναι γνωστές παραπάνω από 180 σε αριθμό και υπερτερούν σε συχνότητα των TEM και SHV¹². Μάλιστα σε διάφορες ευρωπαϊκές μελέτες φαίνεται ότι τα ένζυμα αυτά προσαρμόζονται καλύτερα σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα και γεωγραφικές περιοχές. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2) φαίνεται ότι είναι διαδεδομένα σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες και παρουσιάζεται η κατανομή τους ανάλογα τον κλώνο που υπερτερεί ανά χώρα¹².



Εικόνα 2. Κατανομή των ενζύμων CTX-M στην Ευρώπη¹²

KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase): Η ανακάλυψη του γονιδίου πραγματοποιήθηκε το μακρινό 1996 σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*. Πρόκειται ουσιαστικά για μια ενισχυμένη ESBL, η οποία είναι ανθεκτική επιπλέον στην κεφοξιδίνη και σε όλες τις καρβαπενέμες. Παραμένει ανθεκτική και μετά την προσθήκη αναστολέα⁴. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρβαπενεμασών ανήκει σε τρεις από τις τέσσερις γνωστές κατηγορίες β-λακταμάσης, δηλαδή στις κατηγορίες A, B και D κατά Ambler και μεταφέρονται είτε χρωμοσωμικά είτε μέσω πλασμιδίων. Η *K.pneumoniae* αποτελεί μέχρι στιγμής τον κύριο παραγωγό KPC τάξης A και αντιπροσωπεύει μια από τις σημαντικότερες απειλές στην κλινική πράξη¹³. Έχουν βρεθεί 10 παραλλαγές του γονιδίου που διαφέρουν η μια από την άλλη κατά μία έως τρεις υποκαταστάσεις αμινοξέων (KPC-2 έως KPC-11)¹⁴. Η ακολουθία που εκφράζει την KPC-1 είναι πανομοιότυπη με την KPC-2 οπότε και δεν χρησιμοποιείται ο όρος. Γενικά, οι καρβαπενεμάσες τάξεις A έχουν από 265 έως 269 αμινοξέα. Αυτά τα ένζυμα φέρονται κυρίως σε μεγάλα πλασμίδια και είναι μεταθετά μεταξύ των gram (-) βακτηριδίων μέσω σεξουαλικής σύζευξης. Έτσι πέραν της *K.pneumoniae* υπάρχει διασπορά και στα λοιπά εντεροβακτηριακά όπως *E. coli*, *K. oxytoca*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus spp*¹⁴. Επιπλέον οι KPCs είναι γνωστές και ως βασιζόμενες στη σερίνη καρβαπενεμάσες. Αυτός ο ορισμός προέρχεται από το γεγονός ότι ένας από τους ενεργούς τόπους του ενζύμου περιέχει

ένα υπόλειμμα σερίνης το οποίο επιτρέπει υδρολύσεις πολλαπλών σταδίων του β-λακταμικού δακτυλίου που περιλαμβάνει ακυλίωση και αποακυλίωση¹⁴. Οι KPCs πιο σπάνια εμφανίζονται και σε άλλα gram (-) όπως στην *Pseudomonas aeruginosa* και στο *Acinetobacter spp*¹³. Η ανεπαρκής εμπειρική αντιμικροβιακή θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούνται από KPC-KP έχει συσχετιστεί με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Υπάρχουν παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν σε αποικισμό και στη συνέχεια σε λοίμωξη και αυτοί είναι η προηγούμενη νοσηλεία, η ύπαρξη κεντρικού φλεβικού καθετήρα, η πρόσφατη θεραπεία με καρβαπενέμες ή φλουοροκινολόνη, η ουδετεροπενία, το πρόσφατο χειρουργείο. Ενδημικές χώρες είναι η Ελλάδα, η Ιταλία, η Τουρκία, το Ισραήλ και οι ΗΠΑ¹³.

IRTs (Inhibitor Resistant TEMs), IRSs (Inhibitor Resistant SHVs): Πρόκειται για γονίδια που προσφέρουν αντοχή παρά την προσθήκη του αναστολέα β-λακταμάσης. Γειτνιάζουν με τις TEM και τις SHV β-λακταμάσες. Εμφανίζονται συνηθέστερα στο *E.coli* και την *Klebsiella*. Λιγότερο συχνά ανευρίσκονται στον *Proteus mirabilis* και το *Citrobacter freundii*. Αν προστεθεί στο β-λακταμικό ο αναστελέας ταζομπακτάμη, μπορεί να μείνει ευαίσθητο το μικρόβιο αλλά έχει παρατηρηθεί και αντοχή⁵.

Τάξη B κατά Ambler: Σε αυτή την ετερογενή κατηγορία ανήκουν μόνο οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Οι MBLs στηρίζουν την υδρολυτική δράση τους στα ιόντα ενός μετάλλου. Στον ψευδάργυρο (Zn)^{3,5}. Οι MBLs υδρολύουν ένα ευρύ φάσμα β-λακταμασών όπως καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες αλλά όχι μονοβακτάμες όπως την αζτρεονάμη¹⁵. Καλόν είναι βέβαια να έχουμε κατά νου ότι η συνύπαρξη διαφόρων τάξεων λακταμασών δεν είναι απίθανη. Έτσι αν δούμε αντοχή στην αζτρεονάμη, αυτό υποδηλώνει ταυτόχρονη παρουσία και ESBL⁵. Η υδρόλυση με τις MBLs επιτυγχάνεται μέσω «στρατολόγησης» της υδροξυλικής ομάδας του νερού (-OH) από το ιόν Zn^{2+} , το οποίο βρίσκεται σε ενεργό θέση για να καταστρέψει τους ασθενείς αμιδικούς δεσμούς στη δομή της β-λακταμάσης¹⁵. Για να τεθεί διαφορετικά το θέμα, τα συγκεκριμένα ένζυμα διασπούν τους δακτυλίους των β-λακταμασών μέσω της υδρόλυσης των δεσμών των C (β-άνθρακα καρβονυλ)-N (αζώτου) για να εξουδετερώσουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης¹⁶. Το πυρηνόφιλο υδροξείδιο είναι η αντικατασταθείσα επιλογή για το υπόλειμμα σερίνης για την υδρόλυση του β-λακταμικού μέσω μη ομοιοπολικού μηχανισμού ενώ οι τάξεις A, C και D SBLs (Serine-BLs) χρησιμοποιούν πυρινόφιλη σερίνη για να διασπάσουν τα β-λακταμικά μέσω ενός ομοιοπολικού μηχανισμού¹⁶. Όπως προκύπτει από τα άνω, αν και υπάρχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των υπεροικογενειών των SBLs και των MBLs, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας θραύσης των δεσμών αμιδίου και εστέρα, φαίνεται ότι προέρχονται από διαφορετικούς προγόνους¹⁵. Ανάλογα με το πού απομονώθηκαν για πρώτη

φορά οι MBLs έχουν χωριστεί σε υποκατηγορίες: IMP (Imipenemase), VIM (Verona-Integron Mediated), αυτή φαίνεται να είναι η πιο συχνή στη χώρα μας, AIM (Australia Imipenemase), SPM (San Paolo Metallo-β-lactamase), GIM (Germany Imipenemase) και τέλος η NDM (New Delhi Metallo-β-lactamase) που ανακαλύφθηκε το έτος 2008⁵.

Τάξη C κατά Ambler: Εδώ ανήκουν οι β-λακταμάσες τύπου **AmpC**. Στην ταξινόμηση κατά Bush ανήκουν στην ομάδα -1. Είναι κλινικά σημαντικές κεφαλοσπορινάσες που κωδικοποιούνται στα χρωμοσώματα πολλών εντεροβακτηριακών καθώς και μερικών άλλων ειδών και μεσολαβούν στην αντοχή έναντι της κεφαλοθίνης, κεφαζολίνης, κεφοξιτίνης, των περισσότερων πενικιλινών και της αζτρεονάμης. Επιπλέον δεν αναστέλλονται από το συνδυασμό με αναστολέα. Σε πολλά βακτήρια η παραγωγή AmpC είναι επαγωγίμη, δηλαδή μη σταθερή. Αυτό σημαίνει ότι εξαρτάται και ρυθμίζεται από ένα επαγωγέα ασθενή ή ισχυρό. Στον αντίποδα βρίσκεται η σταθερή και συνεχής (ή ιδιοσυστασιακή) παραγωγή. Τέλος μπορεί η έκφρασή τους να είναι αποκατεσταλμένη δηλαδή να υπάρχει μια μόνιμη υπερπαραγωγή. Τα προβλήματα αντοχής προκαλούνται από την τελευταία και είναι μη αναστρέψιμη. Οι AmpC χρωμοσωμιακής αιτιολογίας βρίσκονται ενσωματωμένες στο χρωμόσωμα του μικροβίου. Οι AmpC πλασμιδιακής αιτιολογίας μεταφέρονται από το ένα μικρόβιο στο άλλο⁵. Οι τελευταίες είναι γνωστές από το 1989 και έχουν απομονωθεί σε νοσοκομεία ανά την υφήλιο. Υπάρχουν ωστόσο και εξωνοσοκομειακά στελέχη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ένζυμα που προσδιορίζονται από πλασμίδιο σχετίζονται, μερικές φορές πολύ στενά, με τις χρωμοσωμικά προσδιορισμένες AmpC λακταμάσες¹⁸. AmpC χρωμοσωμιακής αιτιολογίας εμφανίζονται κυρίως στα ακόλουθα βακτήρια: *Morganella spp*, *Providencia spp*, *Hafnia spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus vulgaris*⁵. AmpC πλασμιδιακής αιτιολογίας (AmpC like) εμφανίζονται κυρίως στα εντεροβακτηριακά: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*. Πιο πάνω αναφέρθηκε η επαγωγίμη παραγωγή των ενζύμων. Οι επαγωγείς χωρίζονται σε ασθενείς και ισχυρούς. Ασθενείς επαγωγείς είναι οι ημισυνθετικές πενικιλίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς (τικαρκιλίνη, πιπερακιλλίνη), η ταξομπακτάμη, η σουλμπακτάμη και οι κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς όπως η κεφταζιδίμη και η κεφοταξίμη. Ισχυροί επαγωγείς είναι η κεφοξιτίνη, το κλαβουλανικό οξύ και η ιμιπενέμη^{5,18}. Οι ασθενείς επαγωγείς εμφανίζονται ευαίσθητοι στις φαινοτυπικές δοκιμασίες ενώ οι ισχυροί όπως είναι αναμενόμενο εμφανίζονται ανθεκτικοί. Εξαιρείται η ιμιπενέμη που είναι και φάρμακο εκλογής όπως και στις ESBLs. Αξίζει να τονιστεί ότι η κεφοξιτίνη ως ισχυρότατος επαγωγέας εμφανίζει αντοχή σε αντίθεση με τις ESBLs και η MIC είναι προφανώς πολύ υψηλή (άνω των 64mg/dl)⁵. Οι AmpC χωρίζονται περαιτέρω σε 6 κύριες κλάσεις και αυτές έχουν ονοματιστεί είτε από το μικρόβιο από το οποίο παρήχθησαν είτε από το μέρος στο οποίο απομονώθηκαν. Τα πλασμιδιακής

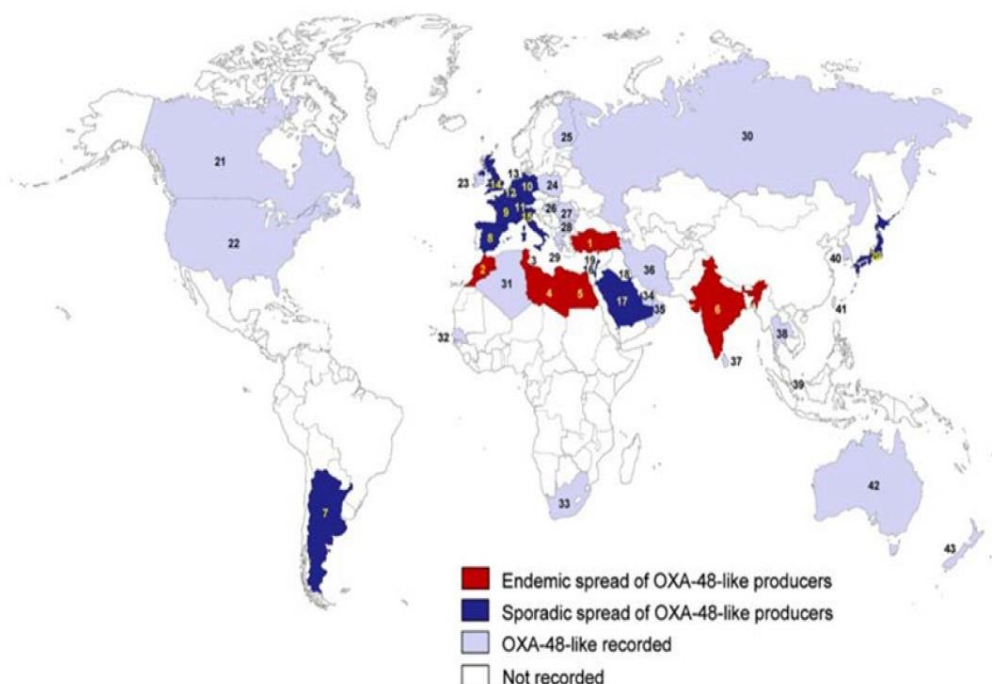
αιτιολογίας ένζυμα φαίνεται ότι προέρχονται από το χρωμόσωμα κάποιου μικροβίου και μεταφέρθηκαν μέσω σύζευξης σε άλλα μικρόβια. Οι 6 κύριες τάξεις και τα αντίστοιχα μικρόβια προέλευσης είναι οι εξής⁵:

Κλάση	Μικρόβιο προέλευσης
CIT	<i>C. freundii</i>
ENT	<i>Enterobacter spp</i>
FOX	<i>Aeromonas spp</i>
MOX	<i>Aeromonas spp</i>
DHA	<i>M. morganii</i>
ACC	<i>H.alvei</i>

Όσον αφορά στην τελευταία κλάση, υποομάδα ACC-1, παρατηρείται ότι τα στελέχη που την παράγουν εμφανίζουν από ευαισθησία έως πολύ χαμηλή αντοχή στην κεφοξιτίνη που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί ισχυρό επαγωγέα του ενζύμου⁵. Γενικά όσο πιο πολύ πιέζονται εξελικτικά τα βακτήρια λόγω των αντιβιοτικών και όσο προχωρούν οι μέθοδοι ανίχνευσης των ενζύμων, τόσο εμπλουτίζονται οι ταξινομήσεις με νέες υποομάδες. Αυτό ισχύει για όλες τις τάξεις κατά Ambler και φυσικά το ίδιο ισχύει και για την τάξη C. Επί παραδείγματι, νέα ένζυμα που τοποθετούνται στην υποομάδα 1e, αποτελούν παραλλαγές της ομάδος 1 με μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι της κεφταζιδίμης και άλλων οξυιμινο-β λακταμών ως αποτέλεσμα υποκαταστάσεων αμινοξέων (εισαγωγών ή διαγραφών). Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται GC1 και CMY. Αυτές έχουν ονομαστεί β-λακταμάσες AmpC ESAC δηλαδή εκτεταμένου φάσματος¹⁹. Άλλη παραλλαγή που περιγράφηκε πρόσφατα είναι μια AmpC που παράγεται από την *P.aeruginosa* με αυξημένη δράση έναντι της ιμιπενέμης²⁰. Η EUCAST υπογραμμίζει ότι ο προσδιορισμός των AmpC είναι σημαντικός για λόγους δημόσιας υγείας καθώς και για κατάρτιση προγραμμάτων ελέγχου λοιμώξεων. Η φαινοτυπική ανίχνευση επιτυγχάνεται εύκολα με την αναστολή των ενζύμων από την κλοξακιλλίνη ή τα παράγωγα του βορονικού οξέος²⁰.

Τάξη D κατά Ambler: Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι οξακιλλινάσες (OXA). Ήταν από τις πρώτες λακταμάσες που ανιχνεύθηκαν. Ονομάστηκαν έτσι από την ιδιότητά τους να υδrolύουν εκλεκτικά την οξακιλλίνη. Η ομάδα αυτή είναι εξαιρετικά ετερογενής και το φάσμα δράσης της μεγάλο. Έχουν περιγραφεί κυρίως στα εντεροβακτηριακά (ειδικότερα στην *K. pneumoniae*), στην *P. aeruginosa* και φυσικά στα είδη *Acinetobacter* στα οποία εμφανίστηκαν

από τη δεκαετία του 1980 και μετά²¹. Η παραγωγή τους προσδίδει αντοχή στην αμινο- και ουρεϊδοπενικιλίνη ενώ διαθέτουν υψηλού επιπέδου υδρολυτική δράση έναντι της κλοξακιλλίνης, της οξακιλλίνης και της μεθικιλίνης. Η δραστηριότητά τους αναστέλλεται ασθενώς από το κλαβουλανικό οξύ αλλά αναστέλλονται ισχυρά από το NaCl²¹. Η εμφάνισή αυτών των ενζύμων σε απομονώσεις στελεχών *Acinetobacter baumannii* που ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, οι οποίες εκδηλώθηκαν με κωδικοποιούμενες από πλασμίδιο λακταμάσες όπως OXA-23, OXA-40 και OXA-58 κατηγοριοποιήθηκαν ως ένζυμα OXA με ομοιότητα αλληλουχίας με προηγούμενες OXA-λακταμάσες. Σε μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι κάθε στέλεχος *A. baumannii* διαθέτει μία χρωμοσωμικά κωδικοποιημένη OXA λακταμάση, μερικές από τις οποίες θα μπορούσαν να προσδώσουν αντοχή έναντι των καρβαπεμενών όταν το γενετικό περιβάλλον που πλαισιώνει το γονίδιο συμμετέχει θετικά στην προαγωγή της έκφρασής του. Έτσι τα είδη *Acinetobacter* που σχετίζονται στενά με στέλεχος *A. baumannii* διέθεταν τις δικές τους χρωμοσωμικά κωδικοποιημένες OXA λακταμάσες. Μερικές θα μπορούσαν να μεταφερθούν στο *A. baumannii* με αποτέλεσμα την έκφραση αντοχής των στελεχών στην καρβαπενέμη²¹. Στις μέρες μας εμφανίζονται εντεροβακτηριακά τα οποία είναι ανθεκτικά στην καρβαπενέμη ως αποτέλεσμα παραγωγής OXA-48 λακταμάσης προκαλώντας θεραπευτικές αποτυχίες²⁰. Το ένζυμο OXA-48 και οι παραλλαγές του είναι ευρέως διαδεδομένα στην *K.pneumoniae*, σε λοιπά εντεροβακτηριακά και στο *A. baumannii*²¹. Τα πρώτα στέλεχος παρατηρήθηκαν στην Τουρκία το 2001 και από τότε εμφανίζονται σε χώρες όπως το Μαρόκο, η Ινδία, η Αίγυπτος, η Λιβύη, η Τυνησία και η Ινδία. Σε πιο μικρά ποσοστά παρατηρήθηκαν και σε ευρωπαϊκές χώρες όπως η Γαλλία, η Ισπανία, η Ολλανδία και η Βρετανία²². Επιπροσθέτως της παραγωγής OXA μπορεί να συνυπάρχει και άλλος μηχανισμός αντοχής όπως ενεργητική εκροή του αντιβιοτικού ή μειωμένη διαπερατότητα μεμβράνης με αποτέλεσμα ενίσχυση της αντοχής έναντι των καρβαπενεμών. Το φάσμα της ενεργότητας του ενζύμου ποικίλλει ανάλογα με τον υπότυπο⁵. Στην Ελλάδα τα περισσότερα *Acinetobacter* εμφανίζουν το γονίδιο OXA-58⁵. Τα πρώτα στέλεχος OXA-58 εμφανίστηκαν στη Γαλλία το 2003. Φαινοτυπικά δεν υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης των OXA ενζύμων. Στη χώρα μας οι περισσότερες επιδημίες από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *Acinetobacter*, οφείλονται σε OXA β-λακταμάσες⁵ ενώ όταν απομονώνεται σε αιμοκαλλιέργεια *K.pneumoniae* με OXA-48, η πρόγνωση είναι πτωχή²².



Εικόνα 3: Χάρτης Παγκόσμιας Κατανομής στελεχών *K. Pneumoniae* που παράγουν OXA-48²²

b. ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ (IMPERMEABILITY)

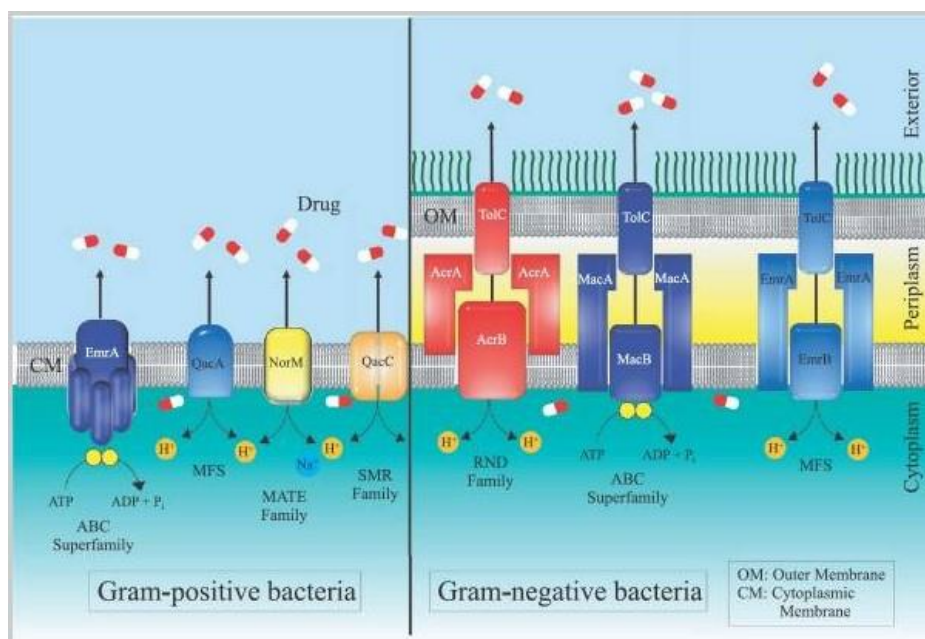
Αφορά κατά κύριο λόγο στην αντοχή που αποκτούν τα gram (-) βακτήρια. Η αντοχή αυτή επιτυγχάνεται με την αδρανοποίηση των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης τους με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η εισροή του αντιμικροβιακού παράγοντα από το εξωτερικό περιβάλλον του μικροβίου, στο εσωτερικό του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα παθογόνου που κάνει χρήση του εν λόγω μηχανισμού αποτελεί η *Ps. aeruginosa* η οποία αδρανοποιεί την πορίνη της εξωτερικής της μεμβράνης OprD. Η αδρανοποίηση είναι άλλοτε άλλη και ανάλογη του μικροοργανισμού και του αντιβιοτικού έναντι του οποίου έχει να αμυνθεί. Υπάρχουν και περιπτώσεις μερικής αδρανοποίησης. Αυτό μεταφράζεται στο αντιβιογράμμα ως ενδιάμεση ευαισθησία²³.

c. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΤΑΙΑΣ ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

Οι αντλίες εκροής είναι πρωτεΐνες που εδράζονται στη μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου και ρυθμίζουν την κίνηση επιβλαβών ουσιών από το εσωτερικό κυτταρικό περιβάλλον προς το εξωτερικό. Ανάμεσα στις επιβλαβείς ουσίες για τα βακτήρια είναι και τα αντιβιοτικά²⁴. Η ύπαρξη λοιπόν αντλίας προσδίδει στο βακτήριο αντοχή. Οι αντλίες εκροής είναι παρούσες σε όλα σχεδόν τα βακτήρια αλλά τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντλίες μπορούν να βρεθούν είτε στο βακτηριακό γονιδίωμα είτε να αποκτηθούν με τη μεσολάβηση πλασμιδίου. Οι αντλίες για να λειτουργήσουν χρειάζονται ενέργεια. Με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο αντλούν αυτή την ενέργεια ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Τις πρωτογενείς και τις δευτερογενείς. Οι πρωτογενείς αντλούν ενέργεια από την ενεργό υδρόλυση του ATP, ενώ οι δευτερογενείς από χημικά στοιχεία που σχηματίζονται είτε από πρωτόνια είτε από ιόντα όπως το νάτριο. Οι αντλίες ταξινομούνται επίσης σε 5 υπερικογένειες:

- I. MFS (Major Facilitator Superfamily)
- II. ABC (ATP binding cassette superfamily)
- III. SMR (Small Multidrug Resistance Family)
- IV. RND (Resistance-Nodulation-cell Division superfamily)
- V. MATE (Multi antimicrobial extrusion protein family)

Οι αντλίες, σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους καθοριστικούς παράγοντες αντοχής στα αντιβιοτικά, είναι πιο συχνά εγγενείς. Τα γονίδια που τις κωδικοποιούν αποτελούν συχνά μέρη ενός οπερονίου του οποίου η έκφραση ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Οι διάφορες μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφρασή τους. Πέραν της αντοχής στα φάρμακα ο φυσιολογικός ρόλος των αντλιών εκροής είναι η αντοχή σε δύσκολο περιβάλλον όπως για παράδειγμα η αντοχή των εντερικών βακτηρίων στη χολή, ευοδώνοντας τον αποικισμό και αυξάνοντας τη λοιμογόνο δράση, την δημιουργία βιοφίλμ και βελτιώνοντας τη βακτηριακή επιβίωση στον ξενιστή²⁵.



Εικόνα 4: Οι πέντε τάξεις των αντλιών εκροής. Η δομή τους διαφέρει στα gram + από τα gram – βακτήρια²⁵

d. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΟΧΟΥ ΔΡΑΣΗΣ

Είτε ο στόχος δράσης του αντιμικροβιακού παράγοντα είναι το κυτταρικό τοίχωμα, είτε η κυτταρική μεμβράνη, είτε η πρωτεϊνοσύνθεση είτε τέλος η σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων, συμβαίνει κάποιο γενετικό γεγονός το οποίο εμποδίζει τον παράγοντα να δράσει στο αντίστοιχο σημείο τροποποιώντας έτσι τον στόχο⁵. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του συγκεκριμένου μηχανισμού αντοχής είναι η ανακάλυψη των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών PBPs. Τα παθογόνα τροποποιούν τις περιοχές σύνδεσης των αντιβιοτικών με διάφορες δομικές περιοχές τους, εν προκειμένω με τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες, ένζυμα τα οποία καταλύουν την αντίδραση για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, με αποτέλεσμα τα αντιβιοτικά τελικά να μη μπορούν να συνδεθούν με αυτές τις περιοχές και άρα να μη μπορούν να δράσουν⁵.

3. ΠΑΛΑΙΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Οι αναστολείς των β-λακταμασών είναι ημισυνθετικά παράγωγα στρεπτομυκήτων. Το **κλαβουλανικό οξύ** είναι ο πρώτος αναστεολέας β-λακταμάσης που εισήχθη στην κλινική ιατρική. Απομονώθηκε από το *Streptomyces clavuligerus* τη δεκαετία του 1970. Η αντιμικροβιακή δράση που ασκούσε ήταν πολύ μικρή αλλά όταν συνδυάστηκε με αμοξικιλίνη, μείωσε σημαντικά την MIC της έναντι gram + και gram – βακτηρίων²⁵. Επιπλέον η προσθήκη κλαβουλανικού διεύρυνε σημαντικά το φάσμα της αμοξικιλίνης για να συμπεριλαμβάνει από τον *S. aureus* και τον *H. influenzae*, μέχρι το *Bacteroides spp.* και εντεροβακτηριακά που παράγουν πενικιλινάσες όπως το *E. coli* και την *Klebsiella spp.* Η δυνατότητα να δίδεται από του στόματος άσκησε μεγάλη θεραπευτική επίδραση στις λοιμώξεις αναπνευστικού της κοινότητας, στις λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων και στις κοιλιακές και γυναικολογικές λοιμώξεις²⁷. Επιπλέον ο συνδυασμός χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην Ευρώπη λόγω της αποτελεσματικότητάς του έναντι των ESBLs²⁸.

Το κλαβουλανικό συνδυάζεται επίσης με την τικαρκιλίνη. Η **τικαρκιλίνη** με το **κλαβουλανικό** ήταν ο πρώτος συνδυασμός αναστολέα με β-λακτάμη που ήταν διαθέσιμος για παρεντερική χρήση. Η τικαρκιλίνη είναι αποτελεσματική έναντι του *Haemophilus spp.* και των εντεροβακτηριακών *E. coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.* και έναντι της *P. aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Bacteroides spp.* Ωστόσο και εδώ ο συνδυασμός αυξάνει τη δράση έναντι στελεχών που παράγουν λακταμάση. Παραδόξως η τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό ασκεί δράση και έναντι του αζυμοτικού μικροβίου *S.maltophilia* και η χρήση του συνεργικά και με άλλα αντιβιοτικά (π.χ. αζτρεονάμη) οδηγεί σε θανάτωσή του²⁹.

Η **σουλμπακτάμη** και η **ταζομπακτάμη** είναι πενικιλινικές σουλφόνες που αναπτύχθηκαν περίπου μία δεκαετία αργότερα από την φαρμακοβιομηχανία²⁶. Η **αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη** αυξάνει τη δραστικότητα της πρώτης έναντι των στελεχών που παράγουν λακταμάση. Ο συνδυασμός κυκλοφόρησε γύρω στο 1987 και ήταν ιδανικός για θεραπεία πολυμικροβιακών λοιμώξεων όπως κοιλιακές, γυναικολογικές, χειρουργικές, πνευμονία από εισρόφιση, οδοντικά αποστήματα και λοιμώξεις διαβητικού ποδιού. Παρόλα αυτά σταδιακά αποκτήθηκε αντοχή όπως φάνηκε σε μελέτη απομονωθέντων *E. coli*³⁰ ενώ επιπροσθέτως η σουλμπακτάμη δεν απορροφάται καλά από το στόμα με αποτέλεσμα να είναι επιτακτική η παρεντερική της χορήγηση³¹.

Η **πιπερακιλλίνη** σε συνδυασμό με την **ταζομπακτάμη** κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ το 1993. Η πιπερακιλλίνη είναι μια πενικιλίνη ευρέως φάσματος που είναι βακτηριοκτόνος έναντι πολλών gram + και gram – αεροβίων και αναεροβίων βακτηρίων³². Η πιπερακιλλίνη μόνη της είναι δραστική έναντι της *P.aeruginosa*, του πνευμονιόκοκκου, του στρεπτόκοκκου, του *E. faecalis*, αναεροβίων βακτηρίων, Η δράση αυτή διατηρείται όταν συγχωρηγείται με αναστολέα και επεκτείνεται έναντι περισσότερων εντεροβακτηριακών, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* και *M. catarrhalis* που παράγουν β-λακταμάση ενώ παράλληλα μειώνεται η MIC έναντι των στελεχών που εκφράζουν ESBLs²⁷.

Και οι τρεις παλαιοί αναστολείς β-λακταμάσης το κλαβουλανικό, η σουλμπακτάμη και η ταζομπακτάμη είναι αποτελεσματικοί έναντι πολλών β-λακταμασών της κατηγορίας A κατά AmpC όπως αυτές αναλύθηκαν παραπάνω. Ωστόσο δεν παρέχουν προστασία έναντι των β-λακταμασών κατηγορίας B, C και D (κατά Ambler). Αυτοί οι αναστολείς παρείχαν εξαιρετική κάλυψη απέναντι σε παθογόνα κατά την πρώτη εμφάνιση των ESBLs. Ωστόσο αποδείχτηκαν αναποτελεσματικοί απέναντι σε στελέχη που εξέφραζαν πολλαπλά ESBLs, β-λακταμάσες τύπου AmpC που κωδικοποιούνται από πλασμίδιο ή καρβαπενεμάσες σερίνης όπως KPC. Καθώς οι β-λακταμάσες KPC και άλλες καρβαπενεμάσες συνέχισαν να εξαπλώνονται, προέκυψε η ανάγκη για νέους αναστολείς³³.

4. ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η κύρια νέα ομάδα αναστολέων όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω είναι τα διαζοκυκλοοκτάνια. Η avibactam και η relebactam έχουν πάρει έγκριση από τον FDA³⁴⁻³⁶, ενώ από τα παράγωγα βορονικού οξέος έχει πάρει έγκριση μόνο η vaborbactam³⁷.

a. AVIBACTAM (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: CEFTAZIDIME/AVIBACTAM)

Η **Avibactam** (AVI) γνωστή και ως AVE1330A και NXL 104 είναι μέλος της νέας ομάδας αναστολέων των β-λακταμασών γνωστών ως διαζοδυκυκλοοκτάνια (diazobicyclooctanes DBOs)³³ μαζί με την relebactam, τη vaborbactam και τα παράγωγα του βορονικού οξέος³³. Ο μοριακός τύπος του Avibactam sodium είναι το $C_7H_{10}N_3O_6SNa$ ενώ η χημική δομή του φαίνεται στην Εικόνα 5³⁸. Ειπώθηκε και παραπάνω ότι η αντιμικροβιακή δράση των αναστολέων, όταν συνδυάζονται με ένα β-λακταμικό αντιβιοτικό, ενισχύεται ενώ παράλληλα προστατεύουν τον β-λακταμικό παράγοντα από τη δράση ενζύμων που παράγουν τα μικρόβια και έχει ως αποτέλεσμα τη λύση τους. Η Avibactam μετά από 30 χρόνια έλλειψης νέων αναστολέων εισάγεται στην κλινική πράξη. Είναι ένας αναστολέας β-λακταμάσης με μηχανισμό που βασίζεται γύρω από μια δικυκλική δομή πυρήνα, που είναι σε θέση να ακυλιώνει την ενεργή θέση της β-λακταμάσης της σερίνης με αναστρέψιμο τρόπο. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες κατηγορίες αναστολέων (με βάση τη β-λακτάμη) όπου η ακυλίωση ακολουθείται από αναδιάταξη και κατακερματισμό και άρα μη αναστρέψιμη αναστολή καθώς η απελευθέρωση της ουσίας από την δραστική θέση οδηγεί σε αναγέννηση και ανακύκλωση του αναστολέα³³. Η Ceftazidime (CAZ) είναι τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνη δραστική έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*³⁵. Η **Ceftazidime-Avibactam** (εμπορική ονομασία: Zavicefta) ως ένας ενδοφλέβιος συνδυασμός σε μια σταθερή αναλογία ceftazidime:avibactam 4:1, έχει εγκριθεί από 2015 για τη θεραπεία επιπλεγμένων λοιμώξεων

του ουροποιητικού συστήματος, περίπλοκων ενδοκοιλιακών λοιμώξεων, νοσοκομειακής πνευμονίας καθώς και πνευμονίας σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα. Επίσης αξιολογείται για να πάρει έγκριση για ασθενείς με κυστική ίνωση. Ο συνδυασμός έχει πάρει έγκριση και στις ΗΠΑ (εμπορική ονομασία: Avicazo), για χορήγηση στους ενήλικες για θεραπεία επιπλεγμένων ενδοκοιλιακών λοιμώξεων σε συνδυασμό με μετρονιδαζόλη, του ουροποιητικού συμπεριλαμβανομένης της πυελονεφρίτιδας και της νοσοκομειακής πνευμονίας και πνευμονίας σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα, που προκαλούνται από gram (-) μικρόβια. Τα τρέχοντα δεδομένα προέρχονται κυρίως από το συνεχιζόμενο παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης του Διεθνούς Δικτύου για την παρακολούθηση Βέλτιστης Αντοχής (INFORM: International Network For Optimal Resistance Monitoring), στο οποίο έχουν συλλεχθεί gram (-) απομονωθέντα από κλινικά δείγματα από τοποθεσίες σε 40 χώρες (συμπεριλαμβανομένων 19 ευρωπαϊκών χωρών). Αυτά μελετήθηκαν σε in vitro δοκιμασίες ως προς την ευαισθησία τους στην ceftazidime/avibactam³⁵. Η avibactam που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε σταθερή συγκέντρωση 4μg/ml. Σε πάνελ με ζωμούς μικροαραιώσεων συγκρίθηκε με μια σειρά παραγόντων σύμφωνα με τη μεθοδολογία του CLSI³⁵. Ο συνδυασμός ceftazidime/avibactam επιδεικνύει εξαιρετική in vitro δράση έναντι των *εντεροβακτηριακών*. Συγκεκριμένα στην μελέτη των απομονωθέντων που συλλέχθηκαν για το INFORM κατά το χρονικό διάστημα 2012-2104, το 99,5% του συνόλου των απομονωθέντων ήταν ευαίσθητα. Επίσης η δραστηριότητα του συνδυασμού ήταν σταθερά υψηλή έναντι όλων των πιο συχνά απομονωθέντων διαφόρων ειδών *εντεροβακτηριακών* (*E.coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* και *P. mirabilis*). Η MIC που απαιτήθηκε για την αναστολή του 90% των απομονωθέντων (MIC90) έναντι των *εντεροβακτηριακών* ήταν 0,5μg/mL³⁵. Η καλή δραστηριότητα που παρουσιάζει έναντι διαφόρων κλινικά σημαντικών ανθεκτικών έναντι των β-λακταμικών βακτηρίων, τα οποία παράγουν β-λακταμάσες την κάνει πολύτιμο αντιμικροβιακό παράγοντα³⁶. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει δραστηριότητα έναντι ενζύμων τάξης A κατά Ambler όπως οι εκτεταμένοι φάσματα πενικιλινάσες (ESBLs) και *Klebsiella pneumoniae* καρβαπενεμάσες (KPCs), τάξης C (όπως AmpC), και κάποιες της τάξης D (οξακιλλινάσες που υδρολύουν την oxacillin όπως τα ένζυμα OXA-48, OXA-10) όχι όμως και έναντι των ενζύμων OXA23 και OXA-24/40. Η Ceftazidime/Avibactam επιδεικνύει επίσης εξαιρετική in vitro δράση έναντι της *P.aeruginosa*. Συνολικά το 92% των απομονωθέντων που συλλέχθηκαν για το INFORM ήταν ευαίσθητα. Η MIC90 για την CAZ/AVI έναντι των στελεχών της *ψευδομονάδας* ήταν 8μg/mL³⁵. 76% των στελεχών που παρήγαγαν KPC ήταν επίσης ευαίσθητα στον συνδυασμό³⁴. Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι ότι παρά το ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα, δεν είναι δραστική έναντι των μεταλλο-β-λακταμασών δηλαδή τάξης

Β όπως MBL, NDM, VIM και IPM^{37, 39}. Ωστόσο και αυτό το θεραπευτικό πρόβλημα μπορεί να λυθεί με συνδυασμό του CAZ/AVI με αζτρεονάμη όπως έχουν δείξει in-vitro μελέτες, καθώς και μελέτες παρατήρησης. Επιπλέον αυτός ο συνδυασμός καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη αναστολή πολλαπλών PBPs (μηχανισμός αντοχής που αναφέρεται παραπάνω)⁴⁰. Όσον αφορά στην in vivo δραστηριότητα αυτή έχει αποδειχτεί σε αρκετές μελέτες σε ζώα υποστηρίζοντας τα ευρήματα in vitro. Το βακτηριακό φορτίο (το οποίο αποτελούνταν από εντεροβακτηριακά που παρήγαγαν ESBL-, AmpC-, και KPC και από *P.aeruginosa*) φάνηκε να μειώνεται σημαντικά σε μοντέλα λοιμώξεων πνεύμονα και μαλακών μορίων σε ανοσοεπαρκή και ουδετεροπενικά ποντίκια. Η in vivo δραστηριότητα αποδείχτηκε επίσης σε μελέτες που χρησιμοποιούσαν ένα μοντέλο οξείας θανατηφόρου σηψαιμίας σε ποντίκια που προκαλούνταν από απομονώσεις εντεροβακτηριακών που παρήγαγαν ESBL, AmpC ή KPC⁴¹.



Εικόνα 5. Χημική δομή Avibactam sodium³⁸

b. RELEBACTAM (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: IMIPENEM/RELEBACTAM)

Η **relebactam**, γνωστή και ως MK-7655, είναι ένας νέος αναστολέας β-λακταμάσης DBO, που σχετίζεται στενά με την avibactam. Σε δομικό επίπεδο οι δύο αναστολείς μοιράζονται έναν πανομοιότυπο πυρήνα DBO, ο οποίος διατηρεί ένα παρόμοιο μηχανισμό αναστολής της β-λακταμάσης. Ωστόσο η ρελεβακτάμη φέρει ένα δακτύλιο πιπεριδίνης στην καρβονυλική ομάδα 2 θέσεων που παρέχει ένα θετικό φορτίο στο μόριο για την πρόληψη της απομάκρυνσης

μέσω εξώθησης του αντιβιοτικού από το βακτηριακό κύτταρο. Η ρελεβακτάμη έχει ελαφρώς πιο περιορισμένο φάσμα αναστολής από την avibactam καθώς δεν εμφανίζει *in vitro* δράση έναντι των ενζύμων OXA-48. Ωστόσο παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των β-λακταμασών κατηγορίας A και C *in vitro*. Αν και η relebactam έχει την ίδια ικανότητα με την avibactam στο να αδρανοποιεί β-λακταμάσες κατηγορίας C, πρόσφατα δημοσιευμένες βιοχημικές μελέτες ανέφεραν ότι είναι λιγότερο ικανό μόριο στο να μπλοκάρει ένζυμα κατηγορίας A όπως τα CTX-M-15 και KPC⁴³. Η relebactam δημιουργήθηκε για να ενισχύει τη δράση της ιμιπενέμης. Έδειξε φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική (PK/PD) συμβατότητα και αποτελεσματικότητα τόσο *in vitro* όσο και σε μοντέλα λοίμωξης ποντικών έναντι ανθεκτικών στην καρβαπενέμη στελεχών *εντεροβακτηριακών* και *ψευδομονάδας*⁴⁴. Επίσης ο συνδυασμός αποδείχτηκε αποτελεσματικός και για την θεραπεία της νοσοκομειακής πνευμονίας όσο και της πνευμονίας από αναπνευστήρα, των ουρολοιμώξεων και των επιπλεγμένων ενδοκοιλιακών λοιμώξεων που προκαλούνται από μικρόβια που δεν είναι ευαίσθητα στην ιμιπενέμη σε 2 δοκιμές φάσης III⁴². Πέραν λοιπόν των *εντεροβακτηριακών* και της *ψευδομονάδας* ο συνδυασμός καλύπτει και αναερόβια όπως το *Bacteroides spp.* Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι καλύπτει *εντεροβακτηριακά* με δύσκολους φαινοτύπους αντοχής όπως αντοχή σε όλα τα κλασικά β-λακταμικά και τις φθοριοκινολόνες ενώ είναι δραστικό και έναντι απομονώσεων που παράγουν KPC και ESBL από διαφορετικά είδη *εντεροβακτηριακών* με αλλοιώσεις της πορίνης καθώς και διεθνείς κλώνους *K. pneumoniae* και *E. coli*. Τέλος καλύπτει στελέχη *ψευδομονάδας* που παρουσιάζουν αντοχή στις καρβαπενέμες λόγω αδρανοποίησης της πορίνης (OprD), αλλά και στελεχών που παρουσιάζουν επίκτητη αντοχή σε κεφτολοζάνη/ταζομπακτάμη και ceftazidime/avibactam λόγω παραγωγής ενζύμων OXA εκτεταμένου φάσματος^{43,44}. Αυτό που δε λύνει η relebactam είναι το να κάνει δραστική την ιμιπενέμη έναντι στελεχών που φέρουν μεταλλο-β-λακταμάσες ή έναντι στελεχών *A.baumannii* που παράγουν καρβαπενεμάσες κατηγορίας D (OXA-23, OXA-24/40, OXA-58)⁴⁶.

c. ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΒΟΡΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Τα παράγωγα βορονικού Οξέος είναι ακυλιωτικοί αναστολείς β-λακταμάσης. Αν και ενώσεις με βάση το βόριο, αναπτύχθηκαν αρχικά ως αναστολείς σερίνης β-λακταμάσες, αλλά πρόσφατα αναπτύχθηκαν και ως αναστολείς μεταλλο-β-λακταμάσης. Τα κυκλικά βορονικά τα οποία είναι πιο χρήσιμα από τα προηγουμένως ανεπτυγμένα ακυκλικά βορονικά, αντιδρούν γρήγορα με τις β-λακταμάσες για να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα ενζύμου αναστολέα.

Έτσι μετά από κάποιες πρώτες προσπάθειες για ακυκλικά βορονικά οξέα, η έρευνα επικεντρώθηκε στα κυκλικά βορονικά. Απομένουν να καθοριστούν οι κινητικοί μηχανισμοί δέσμησης των δικυκλικών βορονικών με τις β- λακταμάσες. Μικροβιολογικές μελέτες υποστηρίζουν τις μελλοντικές δυνατότητες αυτών των παραγόντων έναντι των β- λακταμασών⁴⁷.

d. VABORBACTAM (ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ: MEROPENEM/VABORBACTAM)

Η **Vaborbactam** γνωστή και ως RPX-7009 είναι ο πρώτος κλινικά διαθέσιμος αναστολέας β-λακταμάσης με βάση το κυκλικό βορονικό. Αναπτύχθηκε με στόχο την αποτελεσματική αναστολή της επιδημικής κατηγορίας A καρβαπενεμάσες KPC-2 και KPC-3, έχει ένα επίσης ευρύ φάσμα δράσης που καλύπτει άλλες προβληματικές κλινικά σχετικές κατηγορίες A (CTX-M, SHV- και TEM-) και C (DHA- MIR- FOX- και P99-like) β-λακταμάσες που προσδίδουν αντοχή σε κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. Τα διαθέσιμα δεδομένα για την κινητική έχουν δείξει ότι η Vaborbactam παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των προαναφερθέντων ενζύμων. Ωστόσο εμφανίζει ασθενή ισχύ έναντι των β-λακταμασών κατηγορίας D όπως OXA-48 και είναι εντελώς ανενεργή έναντι της κατηγορίας B⁴⁷. Η Vaborbactam εγκρίθηκε αρχικά για χρήση σε συνδυασμό με τη μεροπενέμη το 2017 αποτελώντας τον πρώτο συνδυασμό καρβαπενέμης/αναστολέα β-λακταμάσης διαθέσιμο για χρήση σε ανθρώπους. Ο συνδυασμός είναι δραστικός έναντι των *εντεροβακτηριακών E.coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* και η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια έχει αξιολογηθεί σε δύο τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές: στην TANGO I και την TANGO II που περιλάμβαναν την αντιμετώπιση gram - βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Η TANGO I έδειξε την αποτελεσματικότητα του νέου συνδυασμού σε ουρολοιμώξεις συγκριτικά με την πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, ενώ η μελέτη TANGO II έδειξε την αποτελεσματικότητα της μεροπενέμης/βαμπορβακτάμης στη θεραπεία λοιμώξεων (ουρολοιμώξεων, πνευμονία αναπνευστήρα, επιπλεγμένη πνευμονία, ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις και βακτηραιμίες) που προκαλούνται από ανθεκτικά στην καρβαπενέμη *εντεροβακτηριακά* (CRE). Μικροβιολογικές μελέτες αξιολόγησαν το συνδυασμό σε παγκόσμιο επίπεδο έναντι απομονώσεων *εντεροβακτηριακών* που παράγουν KPC και στις περισσότερες περιπτώσεις φάνηκε να παρέχεται υψηλή δραστικότητα (>95%)⁴⁹. Επιπλέον η προσθήκη varborbactam έχει αποδειχθεί ότι αποκαθιστά την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της μεροπενέμης σε *εντεροβακτηριακά* στελέχη που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία σε αυτή λόγω παραγωγής AmpCs ή ESBLs καθώς και λόγω μειωμένης διαπερατότητας⁵⁰. Παρόλα αυτά η

βαμφορβακτάμη δεν ήταν ικανή να βελτιώσει την δραστικότητα της μεροπενέμης κατά των πολυανθεκτικών μη ζυμωτικών gram – βακτηριδίων και επομένως παρουσιάζει πολύ περιορισμένη δράση έναντι των ειδών *P. aeruginosa* και *Acinetobacter*. Πρόσφατα εγκρίθηκε με ένδειξη για χρήση σε ουρολοιμώξεις³³.

e. ΆΛΛΟΙ ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ:

Οι νέοι αναστολείς που αναφέρονται πιο κάτω βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο μελέτης και δεν έχουν πάρει ακόμη έγκριση.

Η **nacubactam** παλαιότερα γνωστή ως OP0595 και RG6080, είναι αναστολέας DBO ο οποίος αναστέλλει τις β-λακταμάσες σερίνης κλάσης A και C, συνδυάζεται επί του παρόντος με τη μεροπενέμη. Εκτός από τις ανασταλτικές ιδιότητες της β-λακταμάσης, η νακουβακτάμη έχει εγγενή αντιβακτηριακή δράση στοχεύοντας στην PBP2 σε απομονώσεις εντεροβακτηριακών⁴⁹. Όταν συνδυάζεται με μεροπενέμη, έχει δείξει καλή δραστικότητα απέναντι στα πολυανθεκτικά εντεροβακτηριακά συμπεριλαμβανομένων και αυτών που παράγουν MBLs⁵¹. Ο αναστολέας βρίσκεται σε κλινική μελέτη φάσης I³³.

Η **zidebactam** μέχρι πρότινος γνωστή ως WCK 5107 είναι επίσης ένας άλλος αναστολέας DBO με δραστηριότητα PBP2 που αναστέλλει ομοίως τις β-λακταμάσες σερίνης κλάσης A και C και μελετάται σε συνδυασμό με την κεφεπίμη. Σε δοκιμές της MIC ο συνδυασμός κεφεπίμη/ζιδεβακτάμη ήταν δραστικός έναντι εντεροβακτηριακών και *P.aeruginosa* που εκφράζουν β-λακταμάσες ESBLs, AmpC, KPC και OXA-48. Επί του παρόντος ο αναστολέας βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης I³³.

Ο αναστολέας **ETX2514** είναι ένας αναστρέψιμος αναστολέας DBO που σχεδιάστηκε ειδικά για να αναστέλλει β-λακταμάσες κλάσης D πέραν από τις κλάσεις A και C που έτσι κι αλλιώς περιλαμβάνονται στο φάσμα δραστικότητας των άλλων DBOs. Σε σχέση με την αβιμπακτάμη, το μοριακό μοντέλο του ETX2514 εμφανίζει στενότερη ομοιοπολική δέσμευση στην ενεργό θέση της OXA-24. Η αναστολή των β-λακταμασών τύπου OXA επιτρέπει τη χρήση του αναστολέα στην καταπολέμηση του *Acinetobacter spp.* καθώς είναι μικρόβιο που παράγει κατεξοχήν OXA. Ο αναστολέας ETX2514 συνδυάζεται με σουλμπακτάμη και εκμεταλλεύεται τη μοναδική της ιδιότητα να δεσμεύεται με τις βασικές PBPs στα *Acinetobacter spp.* προσφέροντας έτσι καλή δραστικότητα απέναντι στα πολυανθεκτικά αυτά μικρόβια. Ο συνδυασμός έχει ήδη ολοκληρώσει μελέτη φάσης II για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση των ουρολοιμώξεων και σκοπός είναι να αναπτυχθεί ως παράγοντας ειδικός που στοχεύει το *Acinetobacter spp*⁵².

Ο παράγοντας **VRNX-5133** είναι ένας νέος αναστολέας β-λακταμασών βορονικού οξέος με άμεση ανασταλτική δράση έναντι β-λακταμασών σερίνης κλάσης A, C, D και MBLs κατηγορίας B VIM και NDM δραστικός σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακά και *P. aeruginosa*. Ο συνδυασμός με κεφεπίμη έχει δείξει τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* δραστηριότητα έναντι των εντεροβακτηριακών και των στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν ESBL και καρβαπενεμάση. Επί του παρόντος ο αναστολέας βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης I³³.

Η **entmetazobactam**, γνωστή μέχρι πρότινος ως AAI101 είναι ένα μεθυλιωμένο πενικιλανικό οξύ που σχετίζεται με την ταζομπακτάμη. Εμφανίζει δραστηριότητα έναντι πολλών β-λακταμασών σερίνης, ιδιαίτερα ESBLs. Όταν συνδυάζεται με κεφεπίμη εμφανίζει καλή *in vitro* δραστηριότητα έναντι στελεχών *E. coli* που εκφράζουν μεμονωμένες, κλινικά σχετικές β-λακταμάσες καθώς και έναντι εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL. Σε μελέτη που διενεργήθηκε προσφάτως ο συνδυασμός ήταν τουλάχιστον 8 φορές πιο ισχυρός από την πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη. Προς το παρόν ο αναστολέας έχει ολοκληρώσει μια μελέτη φάσης II σε ουρολοιμώξεις³³.

Το μόριο **ANT431** είναι ένα νέο πυριδινό-2-καρβοξυλικό οξύ που σχεδιάστηκε ειδικά για να αναστέλλει τα ένζυμα MBLs και επί του παρόντος βρίσκεται σε προκλινική ανάπτυξη. Ωστόσο έδειξε υπομικρομοριακή ανασταλτική δράση έναντι κεκαθαρμένου ενζύμου NDM-1 και VIM-2 σε μια βιοχημική δοκιμασία, με τουλάχιστον 20 φορές ασθενέστερη αναστολή των VIM-1 και IMP-1. Όταν συνδυάστηκε με μεροπενέμη επέδειξε καλή δραστηριότητα έναντι πολλών εντεροβακτηριακών τα οποία παρήγαγαν NDM-1 αλλά μικρότερη δράση έναντι παραλλαγών που παράγουν MBL. Αν και από αυτά που δείχνουν οι μέχρι τώρα μελέτες δε φαίνεται να αναπτύσσεται ως κλινικά υποψήφιο μόριο λόγω του περιορισμένου εύρους των MBLs που αναστέλλει, μπορεί να λειτουργήσει ως πρότυπο για μελλοντικούς αναστολείς MBL⁵³.

5. ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ CEFTAZIDIME/AVIBACTAM (CAZ/AVI)

Η Avibactam είναι ένας συνθετικός αναστολέας των β-λακταμασών που κυκλοφορεί στο εμπόριο είτε μόνος είτε κυρίως σε συνδυασμό με Ceftazidime. Η δράση του συνοψίζεται στην ενίσχυση της δράσης της Ceftazidime έναντι των *εντεροβακτηριακών* και της *Pseudomonas aeruginosa*. Μόνος του ο αναστολέας δεν ασκεί αντιβακτηριακή δράση³⁸. Στη σημερινή πραγματικότητα ο συνδυασμός CAZ/AVI χρησιμοποιείται στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη κυρίως για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Πιο συγκεκριμένα, επιλεγμένες κοιλιακές λοιμώξεις μπορούν να αντιμετωπιστούν με CAZ/AVI και μετρονιδαζόλη. Ο συνδυασμός φαρμάκων δίδεται σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς άνω των 3 μηνών για την αντιμετώπιση gram (-) μικροβίων: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii complex* and *P. aeruginosa*. Επίσης χρησιμοποιείται σε επιλεγμένες λοιμώξεις ουροποιητικού συμπεριλαμβανομένης της πυελονεφρίτιδας. Μια από τις σημαντικότερες κλινικές χρήσεις είναι ότι δίδεται σε νοσοκομειακή πνευμονία συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας από αναπνευστήρα (σε ασθενείς άνω των 18 ετών). Τέλος χρησιμοποιείται γενικά σε λοιμώξεις που οφείλονται σε gram αρνητικά βακτήρια για τα οποία είναι περιορισμένες οι θεραπευτικές επιλογές. Οι λοιμώξεις αυτές προκαλούνται από *εντεροβακτηριακά* πολυανθεκτικά στελέχη τα οποία παράγουν καρβαπενεμάση. Ειδικότερα προτείνεται για λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae* οι οποίες είναι γνωστό ότι λόγω αντοχής του στελέχους στα αντιβιοτικά σχετίζονται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και θνητότητας, αυξημένο ιατρικό κόστος καθώς και παρατεταμένη νοσηλεία⁵⁵. Η Avibactam διευρύνει το

φάσμα δράσης της Ceftazidime έναντι των πολυανθεκτικών στελεχών όπως αποδείχτηκε από συγκεντρωτικά δεδομένα 5 κλινικών μελετών. Μέχρι στιγμής, το φάρμακο έχει εγκριθεί σε περισσότερες από 40 χώρες και περιοχές σε όλο τον κόσμο συμπεριλαμβανομένης και της Κίνας από το Μάιο του 2019⁵⁶. Ο παράγοντας φαίνεται να είναι καλά ανεκτός σε υγιή άτομα και στους περισσότερους νοσηλευόμενους ασθενείς (είτε παιδιατρικούς είτε ενήλικες) οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ήπιες ή μέτριες σε ένταση. Η θεραπεία με βάση την AVI σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερο βαθμό τόσο κλινικής επιτυχίας όσο και ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με άλλα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για ανθεκτικά στην καρβαπενέμη στελέχη *K. pneumoniae*. Μια μελέτη έδειξε ότι η νοσοκομειακή θνησιμότητα 30 ημέρες μετά τη θεραπεία με είτε CAZ/AVI είτε κολιστίνη για στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση ήταν 9% και 32% αντίστοιχα, υπογραμμίζοντας την ανωτερότητα της CAZ/AVI σε σχέση με την κολιστίνη για θεραπεία βακτηριαμίας⁵⁶. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το ποσοστό νεφρικής βλάβης είναι χαμηλότερο σε ασθενείς που λαμβάνουν CAZ/AVI από ότι είναι σε αυτούς που λαμβάνουν θεραπευτικά συνδυαστικά σχήματα αμινογλυκοσίδης ή κολιστίνης⁵⁸. Αυτές οι κλινικές μελέτες υποστηρίζουν σταθερά το ρόλο της CAZ/AVI ως ένα πιθανό εναλλακτικό παράγοντα ως το τελευταίο καταφύγιο για τη θεραπεία λοιμώξεων από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια. Η χρήση του συνδυασμού έχει αξιολογηθεί σε 21 κλινικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης μιας φάσης IV, έξι μελέτες φάσης II και εννέα μελέτες φάσης I από τον Απρίλιο του 2020^{58,59}.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες συνοψίζονται κυρίως σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας (κνησμό, εξανθήματα, ναυτία), σε εκδηλώσεις από το Γ.Ε.Σ. (ναυτία, έμετος, κοιλιακό άλγος, διάρροια που σχετίζεται με *Clostridium difficile*) και εκδηλώσεις από το Κ.Ν.Σ. (πονοκέφαλο και ζάλη)³⁷. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρθηκαν όμως σε ποσοστό μικρότερο του 1% σε δοκιμές φάσης III είναι διαταραχές του αίματος και του λεμφικού συστήματος (θρομβοπενία, θρομβοκυττάρωση, λευκοπενία), φλεβίτιδα στο σημείο της ένεσης, καντιτίαση, διαταραχή ηπατικής βιοχημείας, υποκαλιαμία, διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας και διαταραχές του δέρματος και του υποδόριου ιστού όπως κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα⁵⁹.

Η νεφρική δυσλειτουργία μπορεί να επηρεάσει τη δράση του φαρμάκου προκαλώντας μειωμένη κάθαρσή του σε αυξημένη έκθεση. Υπάρχουν περιστασιακές αναφορές στη βιβλιογραφία για νευρολογικές εκδηλώσεις απόρροια της προαναφερθείσας κατάστασης όπως τρόμος, μυόκλωνος, σπασμοί, εγκεφαλοπάθεια και κώμα που εμφανίζονται σε ασθενείς με έκπτωση νεφρικής λειτουργίας που έλαβαν το φάρμακο χωρίς προσαρμογή της δόσης⁵⁹.

6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟ ΝΕΟ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ AVIBACTAM

Στην Ευρώπη, έχουν πεθάνει ήδη από το 2015 τουλάχιστον 33.000 άνθρωποι με το ένα τρίτο εξ' αυτών να προέρχονται από τη γειτονική Ιταλία, ως αποτέλεσμα της πολυανθεκτικότητας των *εντεροβακτηριακών* που παράγουν KPC. Λόγω της ενδημικότητας που παρουσιάζουν τα στελέχη αυτά, έχουν ήδη χαρακτηριστεί από το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) των ΗΠΑ ως παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία⁵². Στην Ευρώπη αντίστοιχα, η εμφάνιση αντοχής, ώθησε το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (European Centre for Disease Prevention and Control: ECDC) να προβεί σε ταχεία αξιολόγηση κινδύνου στη Στοκχόλμη τον Ιούνιο του 2018⁶⁰. Είναι γεγονός ότι υπάρχουν ελάχιστα αντιβιοτικά που είναι εμπορικά διαθέσιμα για αυτά τα μικρόβια με αποτέλεσμα ο συνδυασμός να έχει γίνει πρώτης γραμμής επιλογή. Πρόσφατα ο οργανισμός λοιμωδών νοσημάτων της Αμερικής προτείνει τους νέους συνδυασμούς με τους καινούριους αναστολείς ως προτιμώμενους παράγοντες για λοιμώξεις από *εντεροβακτηριακά* που παράγουν KPC και για λοιμώξεις εκτός ουροποιητικού συστήματος⁶¹. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η εισαγωγή τους κατέστησε δυνατή τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων, μια δυνατότητα η οποία δυστυχώς χάθηκε την τελευταία δεκαετία, με τους κλινικούς ιατρούς να αναγκάζονται να καταφύγουν σε θεραπευτικές επιλογές που από καιρό είχαν σταματήσει να χρησιμοποιούν όπως της πολυμυξίνες. Πράγματι, αν και σίγουρα χρήσιμες ως τελικό καταφύγιο όταν κανένα άλλο αντιβιοτικό δε λειτουργεί, οι πολυμυξίνες δε μπορούν να αποτελέσουν λύση όταν υπάρχει διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας λόγω νεφροτοξικότητας, ειδικά σε λοιμώξεις των πνευμόνων. Αλλά και πέραν των ζητημάτων τοξικότητας, τα κλινικά δεδομένα έχουν δείξει ότι οι συνδυασμοί β-λακτάμης και νέων αναστολέων β-λακταμάσης, είναι ανώτεροι έναντι των πολυμυξινών. Υπό αυτό λοιπόν το πρίσμα, αντιλαμβάνεται όλη η ιατρική κοινότητα τη σπουδαιότητα της διατήρησης της δραστηριότητας του CAZ/AVI

μακροπρόθεσμα. Επομένως αυτός ο παράγοντας πρέπει να χρησιμοποιείται με σύνεση και πάντα σύμφωνα με τις αρχές της αντιμικροβιακής διαχείρισης (κατάλληλη δοσολογία φαρμάκου, για ορισμένο χρονικό διάστημα και για τις σωστές ενδείξεις), προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα και να μειωθεί η εμφάνιση και εξάπλωση αντοχής⁶¹.

Παρά την προσπάθεια για διαφύλαξη της δραστηριότητας του νέου παράγοντα, το πρώτο ανθεκτικό στέλεχος στο CAZ/AVI αναφέρθηκε ήδη από το 2015 και μάλιστα σε γυναίκα ασθενή 62 ετών, η οποία δεν είχε ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε αυτόν. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για ένα στέλεχος *K. pneumoniae* το οποίο απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος. Το απομονωθέν στέλεχος ελέγχθηκε για την παρουσία καρβαπενεμασών χρησιμοποιώντας μοριακή μέθοδο in-house PCR (εργαστηριακά αναπτυγμένη) που στοχεύει σε γονίδια καρβαπενεμασών. Το γονίδιο που βρέθηκε ήταν το blaKPC⁶². Έκτοτε αναφέρθηκαν κατ' επανάληψη επεισόδια αποικισμού ή ακόμα και λοίμωξης λόγω ανθεκτικών στελεχών στον αναστολέα, αν και η συνολική αντοχή που έδειξαν μελέτες επιπολασμού και επιτήρησης ήταν σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Όπως επισημάνθηκε και πιο πάνω, ο συνδυασμός δεν είναι δραστικός έναντι των μεταλλο-β-λακταμασών. Σε πολλές λοιπόν περιπτώσεις, η αντοχή στο CAZ/AVI οφείλεται σε στελέχη που παράγουν MBL^{37,38}. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αυξημένη έκφραση του γονιδίου bla KPC, ειδικές μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν καρβαπενέμες, αλλαγές στη διαπερατότητα των κυττάρων (απώλεια πορινών), και έκφραση αντλιών εκροής. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανιστεί αποκατάσταση της ευαισθησίας στη μεροπενέμη, κυρίως λόγω υποκαταστάσεων αμινοξέων ή ακόμη και μεταβολών στη δραστική θέση των ενζύμων καρβαπενεμάσης, οδηγώντας σε χαμηλές MICs. Παρόλα αυτά, σε αυτές τις περιπτώσεις η χρήση καρβαπενέμης δεν ενδείκνυται διότι μετά τη χρήση τους οι MICs θα μπορούσαν να αυξηθούν και η αντοχή στο CAZ/AVI να παραμείνει. Αυτό που γίνεται συνήθως ωστόσο, είναι να χρησιμοποιείται τελικά η μεροπενέμη ως επιλογή κατά των εντεροβακτηριακών που παράγουν KPC, σε συνδυασμό με κολιστίνη και αμινογλυκοσίδες, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος θεραπευτικής αποτυχίας. Για τη θεραπεία λοιμώξεων ανθεκτικών στο CAZ/AVI είναι πλέον διαθέσιμα και νέα μόρια όπως αυτά που αναφέρθηκαν πιο πάνω (μεροπενεμη-βαμπορμπακτάμη και ιμιπενέμη-ρελαμπακτάμη)^{44,48}. Σημαντικό ρόλο στο ποσοστό της θνησιμότητας των ασθενών με ανθεκτικές στο συνδυασμό συστηματικές λοιμώξεις παίζουν και οι συννοσηρότητες των ασθενών (καρκίνος, μεταμόσχευση, καρδιοπάθειες). Επιπλέον το υψηλό ποσοστό απομονωθέντων στελεχών ανθεκτικών στο CAZ/AVI σε ασθενείς με σημαντικές συννοσηρότητες, αντικατοπτρίζει κυρίως την εκτεταμένη έκθεση σε αντιβιοτικά σε αυτό τον πληθυσμό και όχι τόσο την προκαλούμενη δημιουργία αντοχής λόγω υπερέκθεσης στο

CAZ/AVI καθ' αυτό. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάπτυξη των μηχανισμών αντοχής ανά κατηγορία:

A. Παραλλαγές β-λακταμάσης

Οι παραλλαγές της β-λακταμάσης είναι ένας σημαντικός μηχανισμός βακτηριακής αντοχής στο CAZ/AVI. Η μεταβολή των βασικών υπολειμμάτων (residues) στις ενεργείς θέσεις της σερίνης β-λακταμάσης, μπορεί να αυξήσει σημαντικά τις MICs για το CAZ/AVI. Οι σερίνες β-λακταμάσες εξαρτώνται από διαφορετικά διατηρημένες αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την αλληλεπίδραση με τα αντιβιοτικά. Αυτές οι αλληλουχίες περιλαμβάνουν τον βρόγχο Ω, που αποτελείται από τα αμινοξέα 164-179. Πιο συγκεκριμένα το Glu166 και το Asn170 εμπλέκονται στην ακυλίωση και την αποκυλίωση των αντιβιοτικών από β-λακταμάσες. Ο βρόγχος Ω, δρα ως δομική μονάδα πεδίου που αλληλεπιδρά με τα αντιβιοτικά, σχηματίζοντας μια κοιλότητα με την οποία μπορεί να συνδεθεί η β-λακταμάση με το υπόστρωμα. Αυτό επιτρέπει στο καρβονύλιο που βρίσκεται στο δακτύλιο της λακτάμης του αντιβιοτικού να πολωθεί, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα ακυλιωμένου ενζύμου. Η υποκατάσταση αμινοξέων στο ένζυμο KPC μεταβάλλει τη δομή της κοιλότητας στην οποία γίνεται η σύνδεση, μειώνοντας έτσι την αντίσταση στη σύνδεση της CAZ και της ενεργού θέσης του ενζύμου, αυξάνοντας τη δέσμευση της λακταμάσης και την υδρόλυση της CAZ προκαλώντας αύξηση της βακτηριακής αντοχής στο CAZ/AVI. Επίσης μεμονωμένες υποκαταστάσεις αμινοξέων, ιδιαίτερα στις θέσεις 164, 167, 169 και 179 του βρόγχου Ω (η οποία είναι διατηρημένη περιοχή που περιβάλλει τη δραστική θέση), αυξάνουν τη συγγένεια της β-λακταμάσης με την CAZ οπότε αυξάνουν και την υδρόλυσή της. Επιπλέον, οι υποκαταστάσεις αμινοξέων στο βρόγχο Ω, μπορεί να μειώσουν τη δέσμευση της β-λακταμάσης στο AVI, μειώνοντας την ανασταλτική επίδραση της AVI στη β-λακταμάση και αυξάνοντας την υδρόλυση του CAZ⁶³. Οι μεταβολές στην έκφραση της β-λακταμάσης μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αντοχή στο CAZ/AVI⁶².

I. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΑ ENZYMA KPC.

Με την εισαγωγή του CAZ/AVI στην κλινική πράξη για την θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC, άρχισαν να αναδύονται αντοχές λόγω κυρίως μεταλλάξεων στο γονίδιο blaKPC. Οι πιο επικρατείς μεταβολές στα ένζυμα KPC, είναι οι KPC-2 και KPC-3. Οι μεταβολές εμφανίζονται ευρέως παγκοσμίως και είναι παρούσες και σε

άλλα εντεροβακτηριοειδή πέραν της *Klebsiella pneumoniae*³³. Οι κύριοι μηχανισμοί που σχετίζονται με το ένζυμο KPC είναι τόσο μεταλλάξεις στο γονίδιο blaKPC όσο και αυξημένη έκφραση του blaKPC. Η αντοχή προκαλείται από υποκατάσταση αμινοξέων στην καρβαπενεμάση που προκαλείται από τη μετάλλαξη blaKPC και μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή στην CAZ/AVI. Κάποιες από τις πιο διαδεδομένες υποκαταστάσεις αμινοξέων που οδηγούν σε αντοχή είναι η Asp179Tyr, η Val240Gly η Asp179Tyr/Ala177Glu και το Asp179Tyr/Thr243Met⁶⁴. Επιπλέον οι υποκαταστάσεις των αμινοξέων που λαμβάνουν χώρα σε διάφορες θέσεις σχετίζονται με διαφορετικά αυξημένα επίπεδα MIC του συνδυασμού. Πέραν των υποκαταστάσεων στα ένζυμα που αλλάζουν τη συγγένεια σύνδεσης του αντιβιοτικού με το βακτήριο, εμφανίζεται και μειωμένη η ικανότητα της AVI να αναστείλει τα ένζυμα αυτά. Έτσι μια μεταβολή που οδηγεί λόγω χάρη στην παραλλαγή KPC-2 με υποκατάσταση Asp179Tyr, θα έχει ως αποτέλεσμα την κατακόρυφη αύξηση της MIC⁶⁴. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 79 παραλλαγές του bla KPC γονιδίου, 31 από τις οποίες προσδίδουν αντοχή στο CAZ/AVI⁶⁵.

Μια εικόνα της κατάστασης που επικρατεί ως προς τον συγκεκριμένο μηχανισμό αντοχής μας δείχνει μονοετής μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2020-2021 σε νοσοκομεία της Ρώμης και δημοσιεύτηκε το 2021⁶⁵. Η μελέτη περιελάμβανε απομονώσεις *K. pneumoniae* από 31 ασθενείς από 6 διαφορετικά νοσοκομεία. Το σύνολο των στελεχών που μελετήθηκαν ήταν 39. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο blaKPC προσδιορίστηκαν με τη μοριακή μέθοδο Sanger sequencing. Το γονίδιο blaKPC ανιχνεύτηκε σε όλα τα στελέχη, είτε μόνο του (32 απομονώσεις), είτε σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη blaCTX-M15 που επίσης προσδίδει αντοχή (7 απομονώσεις). Η μοριακή ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία του άγριου τύπου του ενζύμου KPC-3 στις απομονώσεις τόσο στα 8 ευαίσθητα στο CAZ/AVI στελέχη όσο και σε 5 από τα 31 στελέχη που ήταν ανθεκτικά στο CAZ/AVI. Τα υπόλοιπα 26 στελέχη ανθεκτικά στο CAZ/AVI είχαν 11 παραλλαγές KPC που πιθανώς σχετίζονται με την αντοχή στο CAZ/AVI και 4 από αυτές ήταν νέες. Σε αυτές τις πρόσφατα εντοπισμένες μεταλλάξεις, στα blaKPC-62 και blaKPC-63 αναγνωρίστηκαν σημειακές υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων (θυμίνη με αδενίνη και αδενίνη με κυτοσίνη) οι οποίες προκάλεσαν αντικατάσταση αμινοξέων λευκίνη με γλουταμίνη και τυροσίνη με σερίνη αντίστοιχα. Το ανησυχητικό στην συγκεκριμένη μελέτη της γειτονικής Ιταλίας, είναι ότι κάποιες από τις απομονώσεις στελεχών βρέθηκαν να φιλοξενούν όχι μόνο παραλλαγές KPC, αλλά και άγριου τύπου KPC-3 με εξαιρετικά ανθεκτικό φαινότυπο δηλαδή ανθεκτικό σε CAZ/AVI και καρβαπενέμες. Τα ευρήματα τονίζουν την ανάγκη για στενότερη παρακολούθηση σε μοριακό επίπεδο, προκειμένου να μην εξαπλωθούν οι πολυανθεκτικές παραλλαγές⁶⁵.

II. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ AmpC

Οι υποκαταστάσεις αμινοξέων στα ένζυμα AmpC οδηγούν σε παραλλαγές που είναι πολύ κοινές. Κάποιες απαλοιφές αμινοξέων οδηγούν σε αύξηση των MICs για τον αναστολέα, ενώ άλλες οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα της AVI να αναστείλει τα ένζυμα. Οι αλλαγές ή διαγραφές αμινοξέων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολή της συγγένειας δέσμευσης της AVI με το ένζυμο με αποτέλεσμα αύξηση της αντοχής⁶⁴. Εκτός από τις μεταλλάξεις μπορεί να έχουμε και αυξημένη έκφραση του γονιδίου AmpC (επαγωγή ενζυμικής δραστηριότητας) από την ίδια την AVI όπως φάνηκε χρήση της σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα σε μελέτη όταν επωάστηκαν στελέχη *E. cloacae* και *P. aeruginosa* με AVI σε συγκεντρώσεις 1, 4 και 32mg/L, φάνηκε ότι στην τελευταία συγκέντρωση ο αναστολέας προκάλεσε έντονη έκφραση του AmpC σε 2 από τα 5 στελέχη *Enterobacter* και σε 2 από τα 5 στελέχη *P. aeruginosa*⁶⁶.

III. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ BLA-OXA

Κατά αντιστοιχία με τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις, 265 μικροβιακά στελέχη που παράγουν OXA-48 μελετήθηκαν για το κατά πόσο εμφανίζουν αντοχή στο CAZ/AVI. Φάνηκε λοιπόν ότι σε ένα ποσοστό 7,5% ήταν ανθεκτικά στο παράγοντα. Η αντοχή αποδόθηκε κυρίως σε 2 υποκαταστάσεις αμινοξέων (Pro68Ala και Tyr211Ser). Πιο συγκεκριμένα η ενζυμική κινητική έδειξε ότι σε σύγκριση με το άγριου τύπου ένζυμο OXA-48, το ένζυμο παραλλαγής είχε πάνω από 20 φορές υψηλότερη ικανότητα να υδρολύει το CAZ και πάνω από 5 φορές ικανότητα να μειώνει την δράση του αναστολέα AVI, συμβάλλοντας στην δημιουργία αντοχής⁶⁷.

IV. ΑΝΤΟΧΗ ΑΠΟ ΑΛΛΕΣ, ΣΠΑΝΙΟΤΕΡΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ

Τον Οκτώβριο του 2019, καταγράφηκε μια έξαρση στελέχους *K. pneumoniae* που παράγει ανθεκτική KPC-2 στο συνδυασμό CAZ/AVI. Η αντοχή του στελέχους οφειλόταν σε μια παραλλαγή της βιετναμέζικης β-λακταμάσης-1 εκτεταμένου φάσματος (VEM-1). Η αντοχή οφειλόταν σε παρεμβολή αμινοξέος υποκατάστασης λόγω του οποίου η AVI δε μπορούσε να δεσμευτεί στην ενεργό θέση του ενζύμου, μειώνοντας έτσι την ανασταλτική της δράση⁶⁸.

B. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ CAZ/AVI ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Είναι γνωστό ότι οι β-λακτάμες διεισδύουν στην εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου, μέσω πορινών. Αυτές οι πορίνες αν αλλοιωθούν, συνηθέστερα με αλλοίωση της έκφρασής τους μπορεί να επηρεάσουν τη δραστικότητα της CAZ/AVI. Οι βακτηριακές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης OmpF και OmpC καθώς και οι ομόλογές τους παίζουν ρόλο στην δημιουργία αντοχής. Μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες αυτές που οδηγούν στην απώλεια πορινών επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση του αναστολέα. Παράδειγμα είναι η απώλεια ή μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης OmpK35 που μπορεί να οφείλεται σε μετάλλαξη μετατόπισης του πλαισίου και κωδικόνια πρόωρου τερματισμού. Μια μετάλλαξη μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μη λειτουργικής πορίνης⁶⁴. Παρόλα αυτά κάποιες φορές έχει φανεί ότι ανεπάρκεια έκφρασης πορινών δεν σημαίνει απαραίτητα και περιορισμό της διείσδυσης της Avibactam. Πιο συγκεκριμένα μελέτη στελέχους *K. pneumoniae* που είχε απωλέσει και τις δύο πορίνες (Omp 35 και Omp 36) έδειξε ότι ενώ το στέλεχος ήταν ανθεκτικό στην Ceftazidime, η MIC του CAZ/AVI παρέμενε χαμηλή και άρα το στέλεχος ευαίσθητο. Στην προκειμένη δηλαδή περίπτωση η ανεπάρκεια της πορίνης δεν περιόριζε τη διείσδυση της Avibactam στον περιπλασμικό χώρο. Ωστόσο η MIC του CAZ/AVI σε αυτό το στέλεχος είναι υψηλότερη σε σύγκριση με στέλεχη που εκφράζουν και τις δύο πορίνες⁶⁹.

C. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ CAZ/AVI ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΑΝΤΛΙΑ ΕΚΡΟΗΣ

Η υπερέκφραση των αντλιών εκροής μπορεί να μειώσει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση και την ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά. Βρέθηκε ωστόσο ότι όσον αφορά στα εντεροβακτηριακά το CAZ/AVI εισέρχεται στα βακτηριακά κύτταρα μέσω ενός παθητικού φραγμού. Στα λοιπά βακτήρια όπως η *P. aeruginosa* η δράση του συνδυασμού βελτιώνεται με τη χρήση αναστολέα αντλίας εκροής. Μάλιστα έχει μελετηθεί ο αναστολέας αντλίας PaβN (β-ναπτυλαμίδη φαινυλαλανίνης-αργινίνης), η παρουσία του οποίου μειώνει τις τιμές MIC ορισμένων στελεχών *P. aeruginosa* για το CAZ/AVI⁶⁹. Η υπερέκφραση των γονιδίων *mexA*, *mexB* και *oprM* σε στέλεχη *P. aeruginosa* ανθεκτικά στο CAZ/AVI που απομονώθηκε από ασθενείς με κυστική ίνωση αύξησε τις MICs στο συνδυασμό από 0.5/4 σε 2/4 mg/L. Περαιτέρω

ω ανάλυση έδειξε ότι ο ρυθμός εκροής της αντλίας εκροής συσχετίστηκε με την τιμή MIC. Όσο πιο γρήγορος ο ρυθμός τόσο πιο αυξημένη η MIC για την CAZ/AVI. Ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται η αντοχή είναι κυρίως η αυξημένη δραστηριότητα του συστήματος αντλίας εκροής MexAB-OprM που προκύπτει από την υπερέκφραση του *mexA* και την υπερπαραγωγή AmpC. Γενικά οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντλίες εκροής παίζουν μικρό ρόλο στην δημιουργία αντοχής στο CAZ/AVI⁶⁴.

D. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟ CAZ/AVI ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝΤΑΙ ΑΠΟ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΩΝ PBPs.

Και σε αυτή την περίπτωση δημιουργίας αντοχής λαμβάνουν χώρα υποκαταστάσεις αμινοξέων. Για παράδειγμα στην PBP3 υποκαθίσταται το αμινοξύ Leu169Pro με αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της τιμής MIC για τον συνδυασμό. Σε μελέτη στελέχους *K. pneumoniae* η οποία καλλιεργείτο διαρκώς υπό εκλεκτική πίεση σε ζωμό με συγκεκριμένη συγκέντρωση CAZ/AVI φάνηκε ότι η υποκατάσταση αμινοξέων στο γονίδιο *mdrA* που κωδικοποιεί το PBP2 αύξησε την MIC του CAZ/AVI⁶⁶.

7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟ CAZ/AVI

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της αντοχής στο συνδυασμό CAZ/AVI μπορούν να χωριστούν σε 2 κατηγορίες. Στις **κλασικές φαινοτυπικές** μεθόδους ταυτοποίησης και ευαισθησίας και στις **μοριακές**. Οι κλασικές μέθοδοι ταυτοποίησης βασίζονται σε βιοχημικές ιδιότητες των μικροβίων και προσδιορισμό της ευαισθησίας με ανίχνευση ανάπτυξης παθογόνου παρουσία χάρτινων δισκίων εμποτισμένων με αντιβιοτικά. Η πιο κλασική μεθοδολογία προσδιορισμού ευαισθησίας είναι αυτή της Kirby Bauer⁷¹. Το υπό εξέταση στέλεχος ανακαλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton παρουσία αντιβιοτικών όπως περιγράφηκε παραπάνω και κατόπιν 24ωρης επώασης διαβάζονται οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του μικροβίου πέριξ των δισκίων⁷¹. Άλλη μέθοδος είναι η τεχνική των μικροαραιώσεων σε θρεπτικό ζωμό προκειμένου να προσδιοριστεί η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που θα αναστείλει ορατά την ανάπτυξη του υπό εξέταση στελέχους. Κατά την τεχνική σε ζωμό χρησιμοποιείται πλάκα τιτλοδότησης εντός της οποίας υπάρχουν κοιλότητες με αντιμικροβιακό παράγοντα σε διάφορες αραιώσεις. Αφού εμβολιαστεί το παθογόνο και επωαστεί για 16-20 ώρες διαβάζονται τα αποτελέσματα⁷². Άλλη μέθοδος προσδιορισμού της ευαισθησίας είναι η χρήση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test). Κλασικές πλέον μέθοδοι ταυτοποίησης και προσδιορισμού ευαισθησίας είναι τα αυτοματοποιημένα και τα ημιαυτοποιημένα συστήματα τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον. Το υπό εξέταση στέλεχος εμβολιάζεται σε πάνελ MIC και επωάζεται εντός του μηχανήματος για αρκετές ώρες⁷³. Τέλος η μέθοδος της ανοσοχρωματογραφίας, προσφέρει σε ταχύ χρονικό διάστημα (15 λεπτών) πληροφορίες σε σχέση με τον τύπο του ενζύμου που υδρολύει τα αντιβιοτικά. Ωστόσο η μέθοδος αναγνωρίζει συγκεκριμένα ήδη γνωστά ένζυμα και όχι νέες μεταλλάξεις⁷⁴. Συμπεραίνουμε εύκολα ότι οι κλασικές τεχνικές μπορούν να απαντήσουν μέχρι ενός σημείου στο ερώτημα για την αντοχή των μικροβίων καταδεικνύοντας συγκεκριμένους φαινότυπους αντοχής και αποκαλύπτοντας εμμέσως την παραγωγή συγκεκριμένων υδρολυτικών ενζύμων. Ωστόσο είναι επιτακτική η

ανάγκη για προσδιορισμό πιο συγκεκριμένων πληροφοριών τις οποίες μπορούμε πλέον να έχουμε με τη χρήση μοριακών μεθόδων.

Οι νέες μοριακές μέθοδοι περιλαμβάνουν γρήγορες και αξιόπιστες τεχνικές εύκολες στην εφαρμογή και φιλικότερες στο περιβάλλον. Υποδεικνύουν με ακρίβεια τον τύπο του ενζύμου που αναστέλλει τη δράση των αντιβιοτικών ωστόσο ακόμη δεν παρέχουν ολοκληρωμένες πληροφορίες για το αντιβιογράμμα. Επίσης για να ανιχνεύσουν ένα γονίδιο που προσδίδει αντοχή, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατάλληλοι εκκινητές. Άρα το υπό ανίχνευση γονίδιο θα πρέπει να είναι γνωστό.

Η αναγνώριση των ειδών των βακτηρίων και της αντιμικροβιακής ευαισθησίας στις μέρες μας επιτυγχάνεται εύκολα με το σύστημα MALDI-TOF MS. Το σύστημα σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει ανάλυση πρωτεϊνικών και πεπτιδικών φασμάτων μαζών των μικροβίων (φασματογράφος μάζας), τα οποία ιονίζονται προκύπτοντας φορτισμένα μόρια και στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος μάζα προς φορτίο: m/z ratio⁷⁵. Ο λόγος αυτός προκύπτει από το χρόνο που θα χρειαστεί για να «πετάξει» το σωματίδιο κατά μήκος ενός σωλήνα κενού, παράγοντας ένα χαρακτηριστικό φάσμα το λεγόμενο αποτύπωμα πεπτιδικής μάζας. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται προγράμματα βιοπληροφορικής ως εργαλεία για την επεξεργασία και σύγκριση των υπό εξέταση στελεχών με τη βάση δεδομένων του συστήματος. Κάθε παθογόνο στέλεχος έχει συγκεκριμένο αποτύπωμα. Η μέθοδος παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ενώ το προσωπικό μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της μεθόδου εύκολα⁷⁵.

Άλλη χρήσιμη μέθοδος για την ανίχνευση μηχανισμών αντοχής είναι η ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών. Αυτό γίνεται με τη γενοτύπηση (ανίχνευση συγκεκριμένου γενότυπου-genotyping). Στην ανίχνευση μεταλλάξεων που οδηγούν σε αντοχή στην Anibactam γίνεται χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος αποτελεί επανάσταση στην μελέτη γενετικού υλικού και εφαρμόζεται κατά κόρον στην μοριακή Βιοπαθολογία για έρευνα και διάγνωση. Αποτελεί μια ταχεία και ευαίσθητη μέθοδο που πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης και επαναλαμβανόμενους κύκλους αντιδράσεων. Περιλαμβάνει τη χρήση ενός συνόλου εκκινητών που είναι συμπληρωματικοί στην αλληλουχία DNA-στόχου και του ενζύμου πολυμεράσης που προσθέτει νουκλεοτίδια στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA. Εδώ η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια των βακτηρίων είναι η Real Time PCR⁷⁶ και ειδικότερα έχει βοηθήσει στην διαπίστωση της υπερέκφρασης γονιδίων όπως επί παραδείγματι του blaKPC, γονίδιο το οποίο όπως προαναφέρθηκε όταν εκφράζεται

προσδίδει αντοχή στα στελέχη. Αυτό που πρέπει να έχουμε πάντα κατά νου είναι ότι η PCR εξετάζει ένα μικρό τμήμα ενός γονιδίου και όχι ολόκληρο το γονίδιο.

8. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΟ CAZ/AVI

Η εισαγωγή του CAZ/AVI στην κυκλοφορία βελτίωσε τη δυνατότητα θεραπείας λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά μικρόβια. Ωστόσο με την αυξανόμενη χρήση του σε κλινικά πλαίσια αυξάνεται και η αντοχή. Όπως περιγράφεται και παραπάνω, προκαλεί μεγάλη ανησυχία η αντοχή που δημιουργείται από μεταλλάξεις γονιδίων που μεταφέρονται με πλασμίδια και αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο ευρείας εξάπλωσης της αντοχής στο εγγύς μέλλον. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα το πρόβλημα αντοχής στον παράγοντα το έχουν τα *εντεροβακτηριακά* και η *P. aeruginosa*. Σε ένα παγκόσμιο πρόγραμμα επιτήρησης όπου αξιολογήθηκε το ποσοστό αντοχής σε στελέχη απομονωθέντα από αναπνευστικά δείγματα καθώς και από δείγματα αίματος από 879 ασθενείς με νοσοκομειακή πνευμονία, το ποσοστό αντοχής των *εντεροβακτηριακών* (370 στελέχη), ήταν 1,4% και της *P. aeruginosa* (129 στελέχη) ήταν 11,6%⁶⁸. Σε παγκόσμια μελέτη ως κομμάτι της μελέτης INFORM, στην οποία συμμετείχαν εργαστήρια από Ευρώπη, Ασία-Ειρηνικό, Λατινική Αμερική (χωρίς τη Βόρεια Αμερική), Αφρική-Μέση Ανατολή και Ωκεανία που διεξήχθη σε βάθος της πενταετίας 2012-2016, τα *εντεροβακτηριακά* σε σύνολο 59828 στελεχών είχαν δείκτη αντοχής λιγότερο από 1,6%⁷⁸. Ωστόσο ο δείκτης αντοχής φαίνεται να είναι γεωγραφικά εξαρτώμενος. Τα στοιχεία από τη Λατινική Αμερική και Ευρώπη την περίοδο 2012-2015 έδειξαν ότι τα *εντεροβακτηριακά* (7665 στελέχη) ήταν πολύ ευαίσθητα στο CAZ/AVI με χαμηλό δείκτη αντοχής, 0,3%, ενώ το ποσοστό αντοχής της *P. aeruginosa* (1794 στελέχη) ήταν πολύ υψηλότερο, φτάνοντας το 12,6%⁷⁹. Την ίδια περίοδο, ο δείκτης αντοχής των *εντεροβακτηριακών* στο CAZ/AVI στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού ήταν 1,0%. Το 2015-2017 αυξήθηκε σε 1,9% και περαιτέρω μελέτη της αντοχής έδειξε ότι η Ωκεανία είχε το υψηλότερο ποσοστό αντοχής 88,9%, ακολουθούμενο από την Ασία 51,7%. Η Αφρική-Μέση Ανατολή είχε

49,2%, η Ευρώπη 23,2% και το χαμηλότερο ποσοστό βρέθηκε στη Λατινική Αμερική 12,5%. Μέχρι το 2019 ο δείκτης αντοχής των εντεροβακτηριακών αυξήθηκε κι άλλο στη Λατινική Αμερική φτάνοντας σε ποσοστό 25,3%^{65, 79}.

Η Κίνα σε αποτελέσματα καταγραφής αντιμικροβιακής παρακολούθησης το 2017, έδειξε ότι τα ποσοστά αντοχής ήταν 5,4% και 13,5% για εντεροβακτηριακά και *P. aeruginosa* αντίστοιχα. Συνολικά τα δεδομένα δείχνουν με συνέπεια ότι το ποσοστό αντοχής των πρώτων είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με αυτό της *P. aeruginosa*. Μεγαλύτερη ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι η *P. aeruginosa* που απομονώθηκε από ασθενείς με κυστική ίνωση εμφάνισε πολύ υψηλότερο ποσοστό αντοχής που κυμαίνεται από 24-57%⁸⁰. Φαίνεται να ισχύει η υπόθεση ότι το υψηλότερο ποσοστό αντοχής του CAZ/AVI που παρατηρήθηκε στην *P. aeruginosa* σε σύγκριση με αυτή των εντεροβακτηριακών, θα μπορούσε να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς αντοχής στην καρβαπενέμη. Ο κύριος μηχανισμός που έχει φανεί να προσδίδει αντοχή στην *P. aeruginosa* είναι κυρίως μέσω αντλιών εκροής.

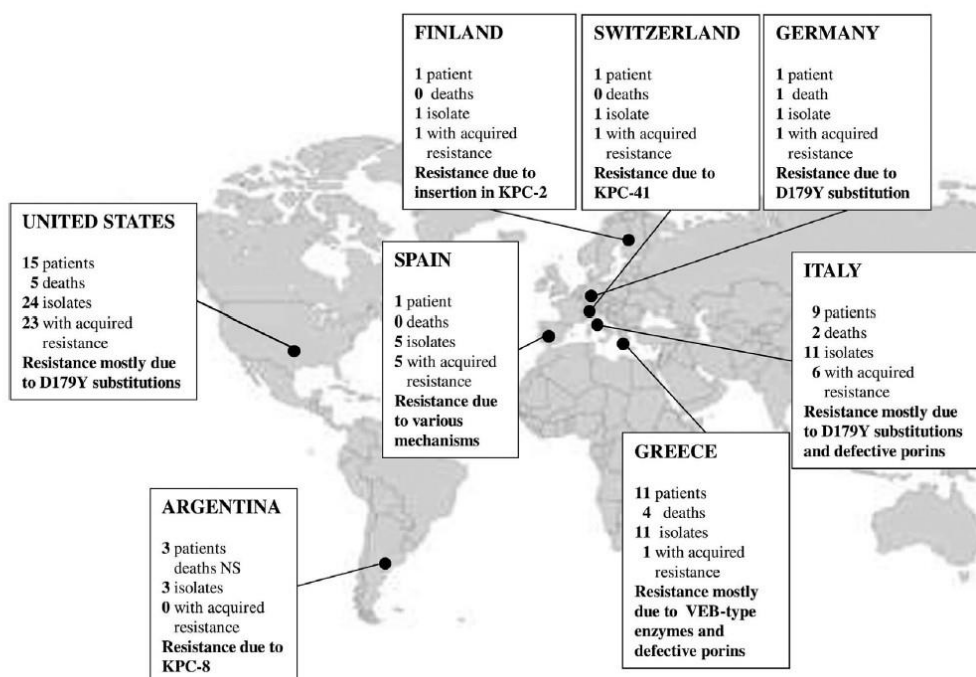
Μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη εξέτασε 872 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae*, τα οποία συλλέχθηκαν πριν από την κλινική χρήση του CAZ/AVI στην Κίνα, έδειξε ότι το ποσοστό αντοχής ανέρχεται στο 3,7%⁸². Ανάμεσα σε αυτά τα ανθεκτικά στελέχη, πάνω από τα μισά (περίπου το 53,1%) παρήγαγαν MBL. Το 40,6% παρήγαγε KPC και το 6,3% των στελεχών παρήγαγε και MBL και KPC. Σε άλλη μελέτη στην Κίνα από πανεπιστημιακό νοσοκομείο όπου συλλέχθηκαν 232 ανθεκτικά στην καρβαπενέμη στελέχη *K. pneumoniae* το ποσοστό αντοχής στο CAZ/AVI ήταν 8,2%. Αξιοσημείωτο είναι ότι εννέα από αυτά τα στελέχη θεωρήθηκαν υπερμολυσματικά, βάσει αποτελεσμάτων που εξήχθησαν από ένα μοντέλο δοκιμασίας πρόκλησης μόλυνσης σε πειραματόζωο (ποντικό), με τελική έκβαση του πειράματος το θάνατο του ζώου⁸². Η αντοχή στο CAZ/AVI όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει ήδη πριν από την κλινική του χρήση και συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, συνάγεται το συμπέρασμα το υπερμολυσματικό στέλεχος αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία⁸³.

Σε πολυκεντρική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από συγγραφική ομάδα της Ελλάδας και έλαβε χώρα από το 2018 μέχρι το 2019, οι ερευνητές μελέτησαν λοιμώξεις, με έμφαση στις βακτηριαμίες, από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC ή OXA-48 και αξιολόγησαν το θεραπευτικό αποτέλεσμα των αντιμικροβιακών παραγόντων. Συμμετείχαν 14 τεταρτοβάθμια νοσοκομεία της χώρας 9 από την Αθήνα και 5 από άλλες πόλεις της επικράτειας⁸⁴. Η ομάδα ασθενών των οποίων οι βακτηριαμίες αντιμετωπίστηκαν με το CAZ/AVI συγκρίθηκαν με ομάδα ασθενών που έλαβαν άλλες θεραπείες που παρουσίαζαν in vitro δραστηριότητα. Σε 147 ασθενείς, οι 140 είχαν στέλεχος που παρήγαγε KPC και οι 7 στέλεχος που παρήγαγε OXA-48. 68 ασθενείς έλαβαν μονοθεραπεία CAZ/AVI και 79 έλαβαν

συνδυασμό του CAZ/AVI με τουλάχιστον άλλο ένα ενεργό παράγοντα (κολιστίνη, τιγκεκυκλίνη, φωσφομυκίνη, γενταμυκίνη, μεροπενέμη, αμικασίνη). Η θνητότητα στις 14 και στις 28 μέρες ήταν 9% και 20% αντίστοιχα. Το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας 37,8% παρατηρήθηκε στους ασθενείς με νοσοκομειακή πνευμονία ή πνευμονία από αναπνευστήρα, ενώ το χαμηλότερο σε αυτούς με επιπλεγμένες ενδοκοιλιακές λοιμώξεις (13,3%) και επιπλεγμένη ουρολοίμωξη (15,2%). Όσον αφορά στην κλινική επιτυχία αυτή για την 14^η ημέρα ανερχόταν στο 81% δηλαδή 119/147 των ασθενών. Κλινική αποτυχία είχαν στο 10,2% (15/147 ασθενείς) και 8,8 κλινικά απροσδιόριστο αποτέλεσμα. Σε σχέση με την μικροβιολογική ανταπόκριση, την 14^η ημέρα αυτή ανερχόταν στο 50,4% (74/147%). Αυτό σημαίνει ότι το μικρόβιο εκριζώθηκε. Στο 37,4% το μικρόβιο πιθανώς εκριζώθηκε και στο υπόλοιπο 12,2% (18/147 ασθενείς) το παθογόνο παρέμεινε. Εμφάνιση αντοχής στο CAZ/AVI κατά τη διάρκεια της θεραπείας παρατηρήθηκε σε 2 ασθενείς (1,4%). Ο ένας ήταν ασθενής με βακτηριαιμία και είχε λάβει θεραπεία με συνδυασμό άλλων αντιβιοτικών ενώ η άλλη ασθενής είχε επιπλεγμένη ουρολοίμωξη και έλαβε μονοθεραπεία με CAZ/AVI. Υποτροπή της λοίμωξης μετά τη διακοπή της θεραπείας με CAZ/AVI κατά τη διάρκεια της νοσηλείας παρατηρήθηκε σε 6 ασθενείς (4,1%). Οι 2 ασθενείς που είχαν υποτροπή του στελέχους *K. pneumoniae* το οποίο παρήγαγε KPC και ήταν ευαίσθητο στο CAZ/AVI. Οι άλλοι 4 ασθενείς είχαν στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγε τόσο MBL όσο και KPC και ήταν ανθεκτικά στην CAZ/AVI⁸³. Στη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρούνται σε γενικές γραμμές παρόμοιες συχνότητες αντοχής. Αυτό που επίσης φαίνεται και προβληματίζει, είναι ότι η εμφάνιση αντοχής είναι ανεξάρτητη από προηγούμενη έκθεση στον παράγοντα^{77, 81, 84}.

Στη συστηματική ανασκόπηση του Di Bella και συνεργατών συνοψίζεται η εμφάνιση αντοχής στον παράγοντα σε σειρές περιστατικών και σε μεμονωμένες κλινικές περιπτώσεις. Φαίνεται και από αυτή τη μελέτη ότι η αντοχή εμφανίστηκε γρήγορα μετά την έναρξη κυκλοφορίας του φαρμάκου. Κλινικές περιπτώσεις που ανέφεραν την εμφάνιση αντοχής *in vivo* ήταν παρούσες σε 7 χώρες, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 42 ασθενείς που είχαν είτε αποικισμό με ανθεκτικά στελέχη είτε λοίμωξη από αυτά. Το 80% των ασθενών αυτών είναι στις ΗΠΑ (n=14,9 αναφορές), στην Ελλάδα (n=11,3 αναφορές) και στην Ιταλία (n=9,6 αναφορές)⁵⁵. Οι δύο ειδικά τελευταίες χώρες είναι γνωστές και ως ενδημικές για στελέχη μικροβίων που παράγουν KPC γεγονός που δικαιολογεί την εντατική χρήση του CAZ/AVI σε αυτές και επομένως μπορεί να γίνει κατανοητή μια αύξηση της αντοχής λόγω εκτεταμένης χρήσης. Η εν λόγω συστηματική ανασκόπηση αναφέρει ότι περισσότερα από 50 ανθεκτικά στελέχη *εντεροβακτηριακών* που παράγουν KPC έχουν ταυτοποιηθεί, με τα δύο τρίτα αυτών να απομονώνονται σε ασθενείς που είχαν εκτεθεί στον αναστολέα και σχεδόν όλα τα ανθεκτικά

στελέχη ήταν *K. pneumoniae*. Το ένα πέμπτο των ανθεκτικών στελεχών ήταν επίσης ανθεκτικά και στην Colistin και σχεδόν το 80% παρήγαγαν και ESBL. Σημαντική αιτία ανησυχίας στη μελέτη αποτελεί και το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας που σχετίζεται με μολυσμένους με ανθεκτικά στελέχη ασθενείς το οποίο αγγίζει το 37%. Ωστόσο, αυτό το ποσοστό είναι παρόμοιο με εκείνο που περιγράφεται στις λοιμώξεις που προκαλούνται και από ευαίσθητα στο CAZ/AVI εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC. Παρόλα αυτά το ποσοστό θνησιμότητας ασθενών με συστηματικές λοιμώξεις από στελέχη ανθεκτικά στον αναστολέα είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με τη θνησιμότητα ασθενών που έχουν και συννοσηρότητες όπως καρκίνο, καρδιοπάθεια ή είναι λόγω χάρη μεταμοσχευθέντες. Επίσης το υψηλότερο ποσοστό ανθεκτικών στελεχών σε ασθενείς με σημαντικές συννοσηρότητες αντανakλά στην εντατική έκθεση αυτών σε αντιμικροβιακή θεραπεία⁵⁵.



Εικόνα 6: Κατανομή ανά χώρα, ανθεκτικών περιπτώσεων CAZ/AVI και σχετικών χαρακτηριστικών⁵⁵.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικά κυρίως νοσοκομειακά gram αρνητικά στελέχη αποτελούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Τα παλαιότερα διαθέσιμα αντιμικροβιακά έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα ενώ το προφίλ ασφάλειάς τους είναι και αυτό κατώτερο των αναγκών των νοσηλευομένων ασθενών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει εκδώσει κατάλογο προτεραιότητας παθογόνων στελεχών για να κατευθύνει τις προσπάθειες για ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα ανθεκτικά εντεροβακτηριακά καθώς και τα gram αρνητικά *αζυμωτικά* βακτήρια, αποτελούν κρίσιμη προτεραιότητα. Η παραγωγή του νέου αναστολέα Anibactam και πιο συγκεκριμένα ο συνδυασμός του με Ceftazidime (CAZ/AVI), προσφέρει εναλλακτική επιλογή για θεραπεία λοιμώξεων που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν, αλλά θα πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς με τεκμηριωμένα πολυανθεκτικά στελέχη ή ως εμπειρική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν παράγοντες κινδύνου για μόλυνση από στελέχη που είναι πολυανθεκτικά. Η αύξηση της κλινικής χρήσης του Anibactam έχει οδηγήσει ήδη στην ανάπτυξη βακτηριακής αντοχής. Τα παγκόσμια δεδομένα επιτήρησης της βακτηριακής αντοχής καταμαρτυρούν αυτή την πραγματικότητα. Επιπλέον ανησυχητικός είναι και ο ρυθμός αύξησης της αντοχής στον παράγοντα από τα ανθεκτικά στην καρβαπενέμη gram αρνητικά βακτήρια.

Συνοψίζοντας τους μηχανισμούς αντοχής διαπιστώνουμε ότι οι παραλλαγές της β-λακταμάσης, ειδικά αυτές που σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου bla KPC, είναι οι πιο ευρέως αναφερόμενες. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την αντοχή περιλαμβάνουν την υπερέκφραση των αντλιών εκροής, τη μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης και τις γονιδιακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Για όλους αυτούς τους λόγους η χρήση του φαρμάκου θα πρέπει να παρακολουθείται στενά μέσω προγραμμάτων διαχείρισης αντιμικροβιακών

παραγόντων για τον περιορισμό της κατάχρησης του προκειμένου να διατηρηθεί η ευαισθησία των μικροβίων σε αυτόν.

Μελλοντική πρόκληση θα μπορούσε να αποτελέσει για την επιστημονική κοινότητα η χάραξη νέων στρατηγικών. Κάποιες ιδέες προς αυτή την κατεύθυνση είναι η προσπάθεια για εναλλακτική συνδυαστική χρήση της Anibactam με κάποιο άλλο συμπαράγοντα. Άλλο πεδίο πρόκλησης θα μπορούσε να είναι η προσπάθεια για τροποποίηση της χημικής δομής της Anibactam έτσι ώστε να ενισχυθεί η δράση της έναντι ανθεκτικών στελεχών. Επιπλέον μέλημα πρέπει να είναι η μελέτη για βελτιστοποίηση των δοσολογικών σχημάτων διασφαλίζοντας πάντα ότι διατηρούνται τα θεραπευτικά επίπεδα του φαρμάκου στον οργανισμό. Τέλος βοήθεια θα μπορούσε να προσφέρει η χρήση ανοσοενισχυτικών, ενώσεων δηλαδή που ενισχύουν τη δράση των αντιβιοτικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular-structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
2. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289:321-331.
3. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* 2019;431:3472-3500.
4. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10): e 01076-18.
5. Θεόδωρος Καραμπατάκης. Αντιμικροβιακά-Μηχανισμοί Ανάπτυξης Αντοχής Μικροβίων Εγκρίσεις Αντιβιογραμμάτων σε Αυτοματοποιημένο Μηχάνημα. Θεσσαλονική Φεβρουάριος 2015, εκδόσεις «POTONTA».
6. Merijn LM, Salverda J, Arjan GM De Visser, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(6):1015-1036.
7. Datta N Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208:239-241.
8. Page MGP. Extended-spectrum β -lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clin Microbiol Infec*. 2008;14:63-74.
9. Winkler ML, Bonomo RA. SHV-129: A Gateway to Global Suppressors in the SHV β -Lactamase Family? *Mol Biol Evol*. 2016;33:429-441.

10. McDanel J, Schweizer M, Creabb V et al. Incidence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Infections in the United States: A Systematic Literature Review. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38:1209-1215.
11. Pitout JDD. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in the community: the tip of the iceberg? *Cur Pharm Des*. 2013;19:257–263.
12. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 (Supl 1):144 – 153
13. Bassetti M, Peghin M. How to manage KPC infections. *Ther Adv Infect Dis*. 2020;7:1-12.
14. Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy*. 2012;32:399-407.
15. Behzadi P, Garcia-Perdomo HA, Karpinski TM, et al. Metallo- β -lactamases: a review. *Mol Biol Rep*. 2020;47:6281-6294.
16. Wang JF, Chou KC. Metallo- β -lactamases: structural features, antibiotic recognition, inhibition, and inhibitor design. *Curr Top Med Chem*. 2013;13:1242-1253.
17. Mojica FM, Bonomo A.R., Fast W. B1-metallo- β -lactamases: where do we stand? *Curr Drug Targets*. 2016;17:1029–1050.
18. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82.
19. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol*. 2007;2:297-307.
20. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009;53:1766-1771.
21. Evans BE, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:241-263.
22. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol*. 2016;7:895
23. Gonzakez MC, Rocha RDC, Carabarin-Lima A, et al. Location of OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *APMIS*. 2021;213-214.
24. AlMatar M, Albarri O, Makky EA et al. Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacol Rep*. 2020:1-16.
25. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*. 2019; 142:129-145.

26. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol. Rev.* 2010;23:160-201.
27. Bush L.M., Johnson C.C. Ureidopenicillins and β -lactam/ β -lactam inhibitor combinations. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2000;14:409–433.
28. Livermore D.M., Hope R., Mushtaq S., Warner M. Orthodox and unorthodox clavulanate combinations against extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008;14:189–193.
29. Muder R.R. Optimizing therapy for *Stenotrophomonas maltophilia*. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2007;28:672–677.
30. Kaye K.S., Harris A.D., Gold H., Carmeli Y. Risk factors for recovery of ampicillin-sulbactam-resistant *Escherichia coli* in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1004–1009.
31. Foulds G., Barth W.E., Bianchine J.R., et al. Pharmacokinetics of CP-45.899 and pro-drug CP-47.904 in animals and humans. In J. D. Nelson and C. Grassi (ed.), *Current chemotherapy and infectious disease*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1980 p. 353–356.
32. Gin A., Dilay L, Karlowsky J.A., et al. Piperacillin-tazobactam: a β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2007;5:365–383.
33. Bush K., Bradford P.A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbio* 2019;17:295-306.
34. Coleman, K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011;14:550–555 (2011).
35. De Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, et al. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3163–9.
36. Matesanz M, Mensa J. Ceftazidime-avibactam. *Rev Esp Quimioter.* 2021;34:38-40.
37. Volpicelli L, Venditti M., Ceccarelli G. et al. Place in Therapy of the Newly Available Armamentarium for Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Pathogens: Proposal of a Prescription Algorithm. 2021;10:1475.
38. Avycaz (ceftazidime/avibactam) [package insert] Cincinnati. OH: Forest Pharmaceuticals, Inc.;2015.
39. Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G et al. New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the way for the β -Lactams. *Int J Mol Sci* 2020;21:9308.

40. Herrero FS. Ceftazidime-avibactam. *Rev Esp Quimioter.* 2022;40-42
41. Matt S. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the treatment of serious gram-negative bacterial infections. *Drugs.* 2018;78:675-692.
42. Bhowmick T. Clinical Outcomes of Patient Subgroups in the TANGO II Study. *Infect Dis Ther.*2021;10:35-46.
43. Titov I, Wunderink RG, Roquilly A. et al. A Randomized, Double-blind, Multicenter Trial Comparing Efficacy and Safety of Imipenem/Cilastatin/Relebactam Versus Piperacillin/Tazobactam in Adults With Hospital-acquired or Ventilator-associated Bacterial Pneumonia (RESTORE-IMI 2 Study). *Clin. Infect. Dis.* 2021;73:e4539-4548.
44. Arca-Suárez, J, Lasarte-Monterrubbio C, Rodiño-Janeiro B-K, et al. Molecular mechanisms driving the in vivo development of OXA-10-mediated resistance to ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam during treatment of XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75:3209-3217.
45. Mushtaq S, Meunier D. Vickers A. et al. Activity of imipenem/relebactam against *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBLs and carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2021;76:434-442.
46. Fraile-Ribot PA, Zamorano L, Orellana R. et al. Activity of Imipenem-Relebactam against a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates and Isogenic β -Lactam-Resistant Mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020, 64, e02165-19.
47. Cahill ST, Tyrrell JM, Navratilova IH et al. Studies on the inhibition of AmpC and other β -lactamases by cyclic boronates. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj* 2019;1863:742–748.
48. Tsivkovski R, Lomovskayaa O. Biochemical Activity of Vaborbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020;64:e01935-19.
49. Hackel MA, Lomovskaya O, Dudley MN et al. In Vitro Activity of Meropenem-Vaborbactam against Clinical Isolates of KPC-Positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018;62:e01904-17.
50. Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D. et al. Vaborbactam: Spectrum of Beta-Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017;61:e01443-17.
51. Doumith M, Mushtaq S, Livermore DM, Woodford N. New insights into the regulatory pathways associated with the activation of the stringent response in bacterial resistance to the PBP2-targeted antibiotics, mecillinam and OP0595/RG6080. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016;71:2810-2814.

52. Tyrrell JM. Nacubactam antibacterial activity alone and in combination with beta-lactam antibiotics against contemporary Enterobacteriaceae clinical isolates [abstract P1034]. Presented at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Madrid, Spain. 2018.
53. Donnelly R. et al. In vitro activity of cefepime alone and in combination with the broad-spectrum β -lactamase inhibitor VNRX-5133 against ESBL and carbapenamases harbouring Enterobacteriaceae carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp [abstract P1539]. Presented at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Madrid, Spain. 2018.
54. Everett M, Sprynski N, Coelho A. et al. Discovery of a Novel Metallo- β -Lactamase Inhibitor That Potentiates Meropenem Activity against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e00074-18.
55. Di Bella S, Giacobbe D, Maraolo A, et al. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;25:268-281.
56. Torres A, Zhong N, Pachl J, Timsit JF, Kollef M, Chen Z, et al. Ceftazidime–avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non inferiority trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:285–95.
57. Shields RK, Nguyen MH, Chen L, Press EG, Potoski BA, Marini RV, et al. Ceftazidime–avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e00883-17.
58. Van Duin D, Lok JJ, Earley M, Cober E, Richter SS, Perez F, et al. Antibacterial Resistance Leadership Group. Colistin versus ceftazidime–avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*. 2018;66(2):163–71.
59. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A review in the Treatment of Serious Gram Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018; 78:675-692.
60. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Risk Assessment on the Spread of Carbapenemase-Producing Enterobacterales (CPE) Through Patient Transfer between Healthcare Facilities, with Special Emphasis on Cross-Border Transfer; ECDC: Stockholm, Sweden, 2011. Available online:

http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110913_Risk_assessment_resistant_CPE.pdf (accessed on 1 January 2022).

61. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacterales (ESBL-E), carbapenem resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult to treat resistance (DTR- *P. aeruginosa*). Clin Infect Dis. 2021;72:e169–83.
62. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, et al. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59:6605-7.
63. Papp-Wallace KM, Winkler ML, Tracila MA et al. Variants of β -lactamase KPC-2 that are resistant to inhibition by avibactam. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:3710-7.
64. Xiong L, Wang X, Wang Y, Yu W, Zhou Y, Chi X et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. WIREs Mech Dis. 2022;14:e1571.
65. Venditti C, Butera O, Meledandri M, Balice Pia M, Cocciolillo C, Fontana C et al. Molecular analysis of clinical isolates of ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2021; 27(7):1040.e1-1040.e6.
66. Lahiri S, Walkup G, Whiteaker J, Palmer T, McCormack K, Tanudra M et al. Selection and molecular characterization of ceftazidime/avibactam-resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa* strains containing derepressed AmpC. J Antimicrob Chemother. 2015;70:1650-8.
67. Kazmierczak KM, Bradford PA, Stone GG, de Jonge BLM, Sahm, DF. In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam against OXA-48-Carrying Enterobacteriaceae Isolated as Part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Global Surveillance Program from 2012 to 2015. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62:e00592-18.
68. Galani I, Karaikos I, Souli M, Papoutsaki V, Galani L, Gkoufa A, et al. Outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* endowed with ceftazidime-avibactam resistance mediated through a VEB-1-mutant (VEB-25), Greece, September to October 2019. Euro Surveill. 2020; 25:2000028.
69. Lopez-Hernandez I, Alonso N, Fernandez-Martinez M, Zamorano L, Rivera A, Oliver A et al. Activity of ceftazidime-avibactam against multidrug-resistance

- Enterobacteriaceae expressing combined mechanisms of resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(8):499-504
70. Winkler ML, Papp-Wallace KM, Hujer AM, Domitrovic T N, Hujer KM, Hurless KN et al. Unexpected challenges in treating multidrug-resistant gram-negative bacteria: Resistance to ceftazidime avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59:1020–1029
 71. Jan Hudzicki. Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol. 2009 (<https://www.asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>)
 72. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances., *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
 73. Evangelista, A. T. and Karlowsky, J. A. (2016) Automated and Manual Systems for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria, in *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology: International Edition, Second Edition* (eds A. L. Truant, Y.-W. Tang, K. B. Waites, C. Bébéar and R. P. Rennie), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ.
 74. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, Göttig S, Saleh A, Stelzer Y, Gatermann SG, Hamprecht A. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Mar 18. pii: S1198-743X (19)30104-1.
 75. Croxatto A, Prodhom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(2):380-407.
 76. Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *And Clin Chem*. 2107;80:45-72.
 77. Stone GG, Bradford PA, Tawadrous M, Taylor D, Cadatal MJ, Chen Z, et al. In vitro activity of ceftazidime–avibactam against isolates from respiratory and blood specimens from patients with nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia, in a phase 3 clinical trial. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e02356–19.
 78. Ramalheira E, Stone GG. Longitudinal analysis of the in vitro activity of ceftazidime/avibactam versus Enterobacteriaceae, 2012–2016. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:106–15.

79. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, de Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. In vitro activity of ceftazidime–avibactam against clinical isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* collected in Latin American countries: results from the INFORM global surveillance program, 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63:e01814–18.
80. Nolan PJ, Jain R, Cohen L, Finklea JD, Smith TT. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime–avibactam against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;99:115204.
81. Zhang P, Shi Q, Hu H, Hong B, Wu X, Du X, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26:124.e1-4.
82. Li D, Liao W, Huang HH, Du FL, Wei DD, Mei YF, et al. Emergence of hypervirulent ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Chinese tertiary hospital. *Infect Drug Resist.* 2020;13:2673–80.
83. Xu T, Guo Y, Ji Y, Wang B, Zhou K. Epidemiology and mechanisms of Ceftazidime-Avibactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Engineering.* 2022;11:138-145.
84. Karaiskos I, Daikos GL, Gkoufa A, Stefos A, Sympardi S, Chrysos G, et al. Ceftazidime/avibactam in the era of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: experience from a national registry study. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76:775-783.