



# **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

## **ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

### **ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Klebsiella pneumoniae* & *Pseudomonas aeruginosa* ΣΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΛΑΡΙΣΑΣ**

Παπαδημητρίου Ελένη  
Ειδ/νη ιατρός  
Λάρισα, Ιούλιος 2015

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλεπουσα Καθηγήτρια:

✚ **Ευθυμία Πετεινάκη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Μέλη:

✚ **Αναστάσιος Γερμενής :** Καθηγητής Ανοσολογίας

✚ **Ματθαίος Σπελέτας:** Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Μελέτη μηχανισμών αντοχής σε καρβαπενέμες κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και αποτελεί μέρος πειραματικής μελέτης του εργαστηρίου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εισηγήτρια της πτυχιακής εργασίας, κ. Πετεινάκη Εφη, πρώτα απ'όλα για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω τον κόσμο της έρευνας με το να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του ΠΓΝ Λάρισας. Κατά δεύτερον, οφείλω να την ευχαριστήσω για τις υποδείξεις και τις οδηγίες της καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, το συνεχές ενδιαφέρον και την καθοριστική της συμβολή στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και στη διαμόρφωση του κειμένου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον κ. Αναστάσιο Γερμενή και τον κ. Ματθαίο Σπελέτα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για το διδακτικό τους ρόλο και την καθοριστική τους συμβολή στη διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Σάρρου Στέλα, υπεύθυνη του τμήματος Μοριακής Μικροβιολογίας του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθεια της, την αμέριστη υπομονή της και το χρόνο που αφιέρωσε για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.

Ακόμα, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ σε όλους τους συνεργάτες του τμήματος της Μοριακής Μικροβιολογίας, καθώς και σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την προθυμία και τη βοήθειά τους κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, ιδιαίτερα στο χρόνο συλλογής και πρωτογενής επεξεργασίας των κλινικών δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
1. Βακτήρια και φαινοτυπική ταυτοποίηση.....	12
1.1 Οικογένεια <i>Enterobacteriaceae</i> .....	13
1.1.1 <i>Klebsiella spp.</i> .....	14
▪ Μορφολογία.....	14
▪ Φυσιολογία-Μεταβολισμός.....	14
▪ Παράγοντες παθογένειας.....	15
1.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae spp.</i> .....	15
▪ Αντιγονική δομή.....	15
▪ Οικολογία-Επιδημιολογία.....	15
▪ Τόπος εμφάνισης λοίμωξης.....	16
▪ Παράγοντες κινδύνου ξενιστή.....	16
▪ Λοιμογόνοι παράγοντες-Παθογένεια.....	16
▪ Παθογόνος δράση.....	21
▪ Ευαισθησία στα αντιβιοτικά-Θεραπεία.....	22
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
▪ Μορφολογία.....	23
▪ Φυσιολογία-Μεταβολισμός.....	23
▪ Αντιγονική δομή.....	24
▪ Οικολογία-Επιδημιολογία.....	24
▪ Λοιμογόνοι παράγοντες-Παθογένεια.....	24
▪ Παθογόνος δράση.....	26
▪ Διάγνωση.....	26
▪ Ευαισθησία σε αντιβιοτικά-Θεραπεία.....	27
▪ Πρόληψη.....	27
2. Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά.....	28
2.1 Αντιβιοτικά.....	28
2.1.1 Γενικές ιδιότητες αντιβιοτικών.....	28
2.1.2 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών.....	29
2.2 β- λακταμικά αντιβιοτικά.....	31
2.2.1 Καρβαπενέμες.....	32

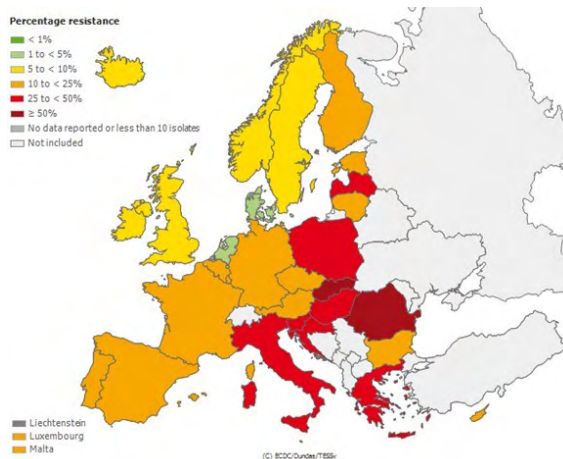
2.3 Ανθεκτικότητα μικροβίων στα αντιβιοτικά.....	33
2.3.1 Ανθεκτικότητα από χρωματοσωματικές μεταβολές.....	35
2.3.2 Ανθεκτικότητα από έξωχρωματοσωματικές μεταβολές – μεταφορά ανθεκτικότητας με πλάσμιδια.....	35
I. βακτηριακή σύζευξη.....	36
II. γενετική μεταμόρφωση.....	38
III. μεταγωγή από βακτηριοφάγους.....	39
IV. μεταθετά γενετικά στοιχεία – τρανσποζόνια.....	40
2.4 Μηχανισμοί αντοχής εντεροβακτηριακών και <i>Pseudomonas aeruginosa</i> στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	40
2.4.1 Παραγωγή β-λακταμασών.....	41
2.4.1.1 Κατάταξη β-λακταμασών.....	42
▪ τάξη A.....	43
▪ τάξη B.....	45
▪ τάξη C.....	46
▪ τάξη D.....	47
2.4.2 Απώλεια πορινών .....	48
2.4.3 Αντλίες εκροής .....	50
2.4.4 Τροποποίηση στόχου δράσης.....	51
3. Επιδημιολογία – Εξάπλωση των KPC & VIM τύπου καρβαπενεμασών.....	52
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
1. Σκοπός της πειραματικής εργασίας.....	57
2. Μέθοδοι και υλικά.....	58
2.1 Βακτηριακά στελέχη.....	58
2.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> και <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
2.3 Ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους.....	59
2.4 Ανίχνευση επιπέδων ευαισθησίας.....	60
2.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα.....	61
2.4.2 Φαινοτυπικές δοκιμασίες με αναστολείς.....	63
2.5 Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA.....	66
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	68
2.7 Ηλεκτροφόρηση.....	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	77
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	87

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκαν στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα στο περιβάλλον του νοσοκομείου και στις ημέρες μας αποτελεί σοβαρό κίνδυνο δημόσιας υγείας. Ιδιαίτερα, τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί μία νέα απειλή που σχετίζεται με τη διασπορά στο νοσοκομειακό περιβάλλον ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram αρνητικών μικροοργανισμών, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι η *P. aeruginosa* και η *K. pneumoniae* από την οικογένεια των εντεροβακτηριακών. Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής σχετίζονται με την παραγωγή δύο καρβαπενεμασών, της VIM και της KPC καρβαπενεμάσης.

Συγκεκριμένα, η *P. aeruginosa* εμφανίζει μεγάλο βαθμού αντοχή στις καρβαπενέμες, όπως φαίνεται στο σχήμα 1 (9 ευρωπαϊκές χώρες >25% των απομονωθέντων στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες). Μεγαλύτερη πρόκληση φαίνεται να αφορά τον έλεγχο διασποράς των εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες ιδιαίτερα όσον αφορά τα στελέχη που παράγουν KPC. Στην ευρώπη τα εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC παραμένουν τα πιο συχνά απομονωθέντα στελέχη (σχήμα 2).



**Σχήμα 1:** *P. aeruginosa*: % αντοχής στις καρβαπενέμες, 2013 (EARS-Net)  
49.3% στην Ελλάδα



**Σχήμα 2:** *K. Pneumonia*: % αντοχής στις καρβαπενέμες, 2013 (EARS-Net)  
59.4% στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα στέλεχος *P. aeruginosa* που παρήγαγε καρβαπενεμάση VIM χρονολογείται πρώτη φορά το 1997, ενώ ως προς την *K. pneumoniae* στελέχη που φέρουν καρβαπενεμάση τύπου VIM απομονώνονται από τις αρχές της δεκαετίας του 2000, και τύπου KPC από το 2007. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Ambler, που

ταξινομεί τις β-λακταμάσες με βάση την ομολογία των αμινοξικών τους αλληλουχιών, οι καρβαπενεμάσες KPC ανήκουν στη μοριακή τάξη A και έχουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, ενώ οι καρβαπενεμάσες VIM ανήκουν στη μοριακή τάξη B και αντί για σερίνη έχουν ιόν ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο.

Η αντοχή ερμηνεύεται ως μια προσπάθεια αυτοσυντήρησης και διαιώνισης των μικροοργανισμών και επιτυγχάνεται είτε μέσω αυτόματων μεταλλαγών στο γονιδίωμα τους είτε με απόκτηση νέου γενετικού υλικού μέσω γενετικών στοιχείων όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεργκρόνια. Η *K. pneumoniae* φαίνεται να έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει μέσω γονιδίων και να διατηρεί πολλούς και ισχυρούς μηχανισμούς αντοχής. Επιπρόσθετα, φαίνεται να έχει την ικανότητα να διασπείρεται κλωνικά μέσα στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Στην *P. aeruginosa* φαίνεται πως ο μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά παραμένει σταθερός τη τελευταία δεκαετία και είναι η παραγωγή του μεταλλοενζύμου VIM.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η ερμηνευτική ανάγνωση του αντιβιογράμματος και η πρόβλεψη των μηχανισμών αντοχής από τους φαινότυπους αντοχής των συγκεκριμένων βακτηρίων στις καρβαπενέμες, είναι ουσιώδης για την κατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία. Στην παρούσα εργασία ερμηνεύονται οι φαινότυποι αντοχής της *K. pneumoniae* και της *P. aeruginosa* στις καρβαπενεμάσες. Παρουσιάζονται οι φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσης των μηχανισμών αντοχής, η συσχέτιση μεταξύ των φαινοτύπων του αντιβιογράμματος και του είδους των παραγόμενων ενζύμων και αναδεικνύονται τα ποσοστά εμφάνισης των συγκεκριμένων ενζύμων στα στελέχη που μελετήθηκαν, όπως προκύπτουν από την ανίχνευσή τους με μοριακές μεθόδους.

Κατά τη χρονική περίοδο 01.01.2014 έως 30.06.2014 επιλέχθηκαν τα 20 πρώτα ανά μήνα απομονωθέντα στελέχη *K. pneumoniae* και της *P. aeruginosa* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, όπως προέκυψε από το αντιβιογράμμα τους. Τα στελέχη απομονώθηκαν μετά από καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων: αίμα, βρογχικές εκκρίσεις, ούρα, πλευριτικό υγρό, ασκитικό υγρό, καθετήρες, κατακλίσεις. Τα κλινικά δείγματα προέρχονταν από ασθενείς που νοσηλεύονταν στις Παθολογικές κλινικές, τη Μ.Ε.Θ., και τις Χειρουργικές κλινικές. Τα περισσότερα στελέχη εμπλέκονταν σε λοιμώξεις που αφορούσαν το ουροποιητικό σύστημα (32,1%), ενώ τα περισσότερα δείγματα προήλθαν από κλινικές του Παθολογικού τομέα (53,2%).

Φαινοτυπικές και μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την επιδημιολογική διερεύνηση των στελεχών. Εγινε ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους, έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και έλεγχος της παραγωγής VIM και KPC καρβαπενεμάσης με φαινοτυπικές δοκιμασίες με αναστολείς καθώς και με μοριακές μεθόδους. Οι μοριακές μέθοδοι περιελάμβαναν την ανίχνευση των γονιδίων *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Για τα στελέχη *K. pneumoniae* που μελετήθηκαν η KPC καρβαπενεμάση ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 82%, ενώ η συνύπαρξη KPC και VIM γονιδίου αφορούσε το 7% των στελεχών. Στα στελέχη *P. aeruginosa* σε ποσοστό 44% ανευρέθηκε το μεταλλοένζυμο VIM, ενώ σε ποσοστό 56% των στελεχών δεν ανευρέθηκε το γονίδιο *bla<sub>VIM</sub>*, γεγονός που συσχετίζει την αντοχή τους με άλλους μηχανισμούς πλην της παραγωγής VIM μέταλλο-β-λακταμάσης, όπως η υπερέκφραση ενεργού αντλίας εκροής, η απώλεια ή μειωμένη έκφραση πορίνης ή και η υπερπαραγωγή AmpC β-λακταμάσης.

Τέλος, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι για τα στελέχη της *K. pneumoniae* τα αποτελέσματα της ανίχνευσης καρβαπενεμάσης συμφωνούσαν απόλυτα με τις φαινοτυπικές μεθόδους αναστολής σε ποσοστό 96,5%, ενώ για τα στελέχη της *P. aeruginosa* το ποσοστό αγγίζει το 77%, γεγονός που αναδεικνύει την ευαισθησία της τεχνικής των φαινοτυπικών δοκιμασιών και καθιστά αναγκαία τη χρήση τους στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική, δεδομένου του χαμηλού κόστους τους και της γρήγορης εφαρμογής τους.



## ABSTRACT

As a result of the ever increasing problem of multiresistant bacteria, we instituted a programme with the aim of identifying the mechanisms of resistance to carbapenems of clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in Thessalia.

Antimicrobial resistance which is a major problem in the hospital environment, nowadays it poses a grave and growing global problem for the public health. Consequently, doctors today are faced with treating infections mainly in hospitalized patients which are associated with the spread of carbapenem-resistant Gram-negative microorganisms, the most important of which is *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* from the *Enterobacteriaceae* family. The main mechanism of antibiotic resistance is related to the production of two carbapenemases, VIM and KPC.

*P. aeruginosa* exhibits the highest rates of resistance to carbapenems (carbapenem resistance rose over 25% in isolates of *K. pneumoniae* in nine European countries). An aggressive approach to prevention further transmission and widespread emergence of *Enterobacteriaceae* producing carbapenemases ( particularly strains producing KPC that are the most frequent isolates ) mounts great challenge to medical society.

In Greece, *P. aeruginosa* strains that produce carbapenemase VIM were reported for the first time in 1997. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* appear to have been uncommon in Greece since the early 2000s, when *K. pneumoniae* strains producing carbapenemase type VIM isolated. Since 2007, *K. pneumoniae* strains that produce carbapenemase KPC have disseminated nationally which is a major issue. The most widely used classification of  $\beta$ -lactamases is the Ambler classification that divides  $\beta$ -lactamases into four classes (A, B, C and D) based upon their amino acid sequences. Carbapenemase KPC (molecular class A) has serine in the active center, while carbapenemase VIM (molecular class B) has zinc ion in its active center.

Bacteria can develop resistance to antibiotics by mutating existing genes (vertical evolution), or by acquiring new genes from other strains or species (horizontal gene transfer). The sharing of genes between bacteria by horizontal gene transfer occurs by many different mechanisms. Mobile genetic elements, including plasmids, transposons and integrons mediate this transfer. *K. pneumoniae* with the ability to produce extended-spectrum beta-lactamases are resistant to many classes of antibiotics and seems to have the ability to disseminate with multiple clones in the hospital environment. Nevertheless, considering *P. aeruginosa* the main mechanism of

resistance to beta-lactam antibiotics remains the production of metalloenzymes VIM in the last decade.

From the above it is obvious that the interpretative reading of the antibiogram and the prediction of resistance mechanisms from resistant phenotypes of those bacteria to carbapenems is essential for appropriate antimicrobial treatment. In this study the resistance phenotypes of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* to carbapenems, which are often used to treat serious infections, are interpreted. The phenotypic tests for detection of the resistance mechanisms and the relationship between the phenotypes of susceptibility testing and type of enzyme produced are presented. Furthermore, the incidence of carbapenemases, produced from the strains we studied, is highlighted.

Between 01/01/2014 and 30/06/2014 the first twenty from every month resistant to carbapenems isolates of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, were selected to be studied further. The strains were isolated after inoculation of clinical specimens: wound-liquids, intravenous catheters, respiratory samples, urine, pleural fluid, ascites and blood. The carbapenem-resistant clinical isolates identified over this 6 month period, recovered from patients, hospitalized in the Internal Medicine, Intensive Care and Surgical nursery units. The majority of the strains were involved in urinary track infections (32.1%).

Phenotypic and molecular methods were applied for the epidemiological study. Phenotypic methods were: antibiotic susceptibility test and methods advocated for detecting carbapenemases based on inhibition their activity by EDTA or/and PBA. The molecular methods included detection of genes *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* by polymerase chain reaction (PCR).

The majority of *K. pneumoniae* isolates (82%) were *bla<sub>KPC</sub>* positive while 7% of the strains were positive for *bla<sub>VIM</sub>* and *bla<sub>KPC</sub>* as well. Furthermore, 44% of *P. aeruginosa* strains were found positive for *bla<sub>VIM</sub>* gene, while 56% of the strains were found negative for *bla<sub>VIM</sub>* gene, which leads to the conclusion of the presence of additional resistance mechanisms, such as loss of outer membrane porins and/or efflux transporter overexpression.

Finally, it is of utmost importance to mention the fact that phenotypic and molecular detection methods share the same result at a rate of 96.5% for *K. pneumoniae* strains, while for *P. aeruginosa* strains this rate was 77%. In conclusion, it is necessary to use in everyday laboratory practice the phenotypic tests, given their high sensitivity their low cost and their quick implementation.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά παθογόνα παγκοσμίως. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η ανάδυση Gram αρνητικών βακτηρίων και κυρίως εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν β-λακταμάσες (κυρίως VIM, IMP, NDM, KPC, και OXA-48), με υδρολυτικές ικανότητες έναντι όλων σχεδόν των β-λακταμικών αντιβιοτικών περιλαμβανομένων και των καρμπαπενεμών.<sup>1</sup>

Η χώρα μας ανήκει στις γεωγραφικές περιοχές με τον υψηλότερο επιπολασμό λοιμώξεων από μικροοργανισμούς με αντοχή σε καρβαπενέμες. Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής σχετίζονται με την παραγωγή δύο καρβαπενεμασών, της VIM και της KPC καρβαπενεμάσης.<sup>2</sup>

Στην Ελλάδα, η πρώτη αναφορά *P. aeruginosa*, η οποία παρήγαγε την καρβαπενεμάση VIM, σημειώθηκε σε μια νοσοκομειακή επιδημία το 1997. Αντίστοιχα στα τέλη του 2002 απομονώθηκαν τα πρώτα στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν VIM από τρία νοσοκομεία της Αθήνας. Ακολούθησε μία γενικευμένη επιδημία στα ελληνικά νοσοκομεία από *K. pneumoniae* που παρήγαγαν VIM καρβαπενεμάση έως το 2008. Στα τέλη του 2007 και στις αρχές του 2008, αναφέρθηκαν δύο περιστατικά ασθενών που νοσηλεύθηκαν σε ελληνικά νοσοκομεία και στη συνέχεια επέστρεψαν στις χώρες τους (Σουηδία και Γαλλία αντίστοιχα), όπου απομονώθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που εμφάνιζαν ένα καινούριο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες, την καρβαπενεμάση KPC.<sup>2</sup>

Στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν KPC είχαν αναφερθεί στην Αμερική ήδη από το 1996 και στη συνέχεια προκάλεσαν επιδημίες, στις ανατολικές πολιτείες της Αμερικής, στην Κίνα και στο Ισραήλ.<sup>2</sup>

Το φαινόμενο αυτό έχει προκαλέσει ιδιαίτερη ανησυχία, διότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί πέρα από την ικανότητα να διασπείρονται ευρέως εμφανίζουν αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιμικροβιακών φαρμάκων (extra drug resistant XDR), με αποτέλεσμα οι θεραπευτικές επιλογές να είναι περιορισμένες. Η συμβολή του μικροβιολογικού εργαστηρίου στο σημείο αυτό είναι σημαντική και συνίσταται στο σχεδιασμό και την εφαρμογή γρήγορων, πρακτικών, ευαίσθητων και ειδικών μεθόδων ανίχνευσης, με στόχο τον περιορισμό της διασποράς των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Βακτήρια και φαινοτυπική ταυτοποίηση

Τα βακτήρια μπορούν να ομαδοποιηθούν με πολλά διαφορετικά συστήματα. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται στην κλινική μικροβιολογία βασίζονται στη φαινοτυπική ταυτοποίηση. Αυτά τα συστήματα χρησιμοποιούν τη βακτηριακή μορφολογία, τις χρώσεις, τις απαιτήσεις σε O<sub>2</sub> καθώς και ποικιλία βιοχημικών εξετάσεων.

Οι μακροσκοπικές και μικροσκοπικές μορφολογίες των βακτηρίων είναι τα πρώτα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και την αναγνώριση των βακτηρίων. Άλλα παραδείγματα μεθόδων φαινοτυπικής ταυτοποίησης είναι η ανάλυση αντιβιογράμματος, όπου παρατηρούνται οι διαφορετικοί συνδυασμοί ευαισθησίας στις διάφορες ομάδες αντιβιοτικών.<sup>3</sup>

Χρώση Gram: Ανακαλύφθηκε από τον H.C. Gram το 1884 και επιτρέπει την κατάταξη των βακτηρίων σε Gram θετικά ή αρνητικά βάσει της μορφολογίας τους και των ιδιοτήτων διαφορικής χρώσης. Τα Gram-θετικά εμφανίζονται κυανά ενώ τα αρνητικά κόκκινα. Η διαφορά οφείλεται στην παρουσία σχετικά μεγάλης ποσότητας πεπτιδογλυκάνης στα Gram-θετικά.<sup>3</sup>

Απαιτήσεις ανάπτυξης: Ένα κύριο διακριτό χαρακτηριστικό είναι το κατά πόσο ένας οργανισμός αναπτύσσεται αερόβια, αναερόβια, είτε και τα δύο, μικροαεροβικά, δηλαδή παρουσία ατμοσφαιρικής πίεσης μικρότερης από εκείνης του οξυγόνου. Οι κατάλληλες ατμοσφαιρικές συνθήκες είναι απαραίτητες για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των βακτηρίων. Άλλες σημαντικές απαιτήσεις ανάπτυξης αποτελούν η θερμοκρασία επώασης, το pH, τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται και η αντοχή στα αντιβιοτικά που υπάρχουν στο περιβάλλον του βακτηρίου.<sup>3</sup>

Αντιγόνα και φάγοι: Πολλά βακτήρια έχουν αντιγόνα που είναι μοναδικά και τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση είναι ισχυρά εργαλεία για την ταυτοποίηση τους (οροτυπία). Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται για να βοηθήσουν την κατάταξη σε επίπεδο είδους είναι το αντιγόνο O του κυτταρικού τοιχώματος, το αντιγόνο H που αφορά την παρουσία μαστιγίου και το αντιγόνο K που αφορά την παρουσία ελύτρου. Τα αντιγόνα αυτά, εκτός από την κατάταξη βοηθούν και στην οροτυπία στελεχών που η επιδημιολογική τους παρακολούθηση είναι σημαντική για τη δημόσια υγεία. Η οροτυπία χρησιμοποιείται επίσης για την αναγνώριση στελεχών υψηλής μολυσματικότητας. Η τυποποίηση μέσω φάγων προσδιορίζει την ευαισθησία σε ένα σύνολο ειδικών βακτηριοφάγων και χρησιμοποιείται κυρίως ως βοήθημα στην επιδημιολογική επιτήρηση ασθενειών. Η τυποποίηση μέσω φάγων είναι τεχνικά περίπλοκη και έχει πλέον αντικατασταθεί από μοριακές τεχνικές.<sup>3</sup>

Τα βακτήρια ταξινομούνται ως επί το πλείστον με βάση τις αντιδράσεις τους σε μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών παρουσία ή απουσία ειδικών βιοχημικών δεικτών. Μερικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται συνήθως για πολλές ομάδες βακτηρίων είναι η δοκιμασία οξειδάσης, η αναγωγή νιτρικών, η ζύμωση ή χρήση υδατανθράκων, ενώ άλλες περιορίζονται σε μια οικογένεια ή είδος όπως η αντίδραση κοαγκουλάσης για τους σταφυλόκοκκους.<sup>3</sup>

Ακολουθεί η περιγραφή δύο συγκεκριμένων βακτηρίων που αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

## 1.1 Οικογένεια *Enterobacteriaceae*

Η ετερογενής οικογένεια των εντεροβακτηριακών περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό Gram αρνητικών βακτηριδίων, τα περισσότερα από τα οποία καθημερινά απομονώνονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο από ποικίλα κλινικά δείγματα.<sup>5</sup>

Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* είναι η μεγαλύτερη ομάδα ανάμεσα στα μη φωτοσυνθετικά Gram αρνητικά βακτήρια. Τα περισσότερα μέλη της είναι ραβδοειδείς, ευθύγραμμοι, ή καμπυλοειδείς βάκιλλοι με διαστάσεις 2-3μm x 0,4-0,6μm. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στους 37°C αν και πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C.<sup>4</sup> Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση, στο χώμα, στο νερό και στα φυτά και, όπως δείχνει το όνομά τους, έχουν την τάση να αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων.<sup>5</sup>

Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα μέλη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών έχουν ορισμένα κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για τη διάκρισή τους από άλλες οικογένειες και την τυποποίησης τους:

1. είναι μη σπορογόνα αερόβια βακτηρίδια με δυνατότητα αναπτύξεως και αναεροβίως
2. ζυμώνουν τη γλυκόζη
3. ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη
4. δεν παράγουν οξειδάση
5. παράγουν καταλάση
6. αναπτύσσονται σε MacConkey άγαρ και σε υλικά που περιέχουν πεπτόνη ή εκχύλισμα κρέατος, ενώ η ανάπτυξή τους δεν ευοδώνεται παρουσία NaCl, και
7. μερικά από αυτά διαθέτουν περίτριχες βλεφαρίδες και επομένως εμφανίζουν κινητικότητα, ενώ άλλα όχι.<sup>5</sup>

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν σημαντικά αίτια λοιμώξεων (π.χ. στο ουρογεννητικό σύστημα). Νοσηλευόμενα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ειδικά ασθενείς που λαμβάνουν

αντιμικροβιακή θεραπεία, συχνά αποικίζονται από Gram αρνητικούς βάκιλλους συμπεριλαμβανομένων και των εντεροβακτηριοειδών. Πολλές φορές ο αποικισμός έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση λοίμωξης.<sup>6</sup>

Ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνεται και η *K. pneumoniae*, βακτήριο που αποτελεί μέρος του αντικειμένου της παρούσας εργασίας.

### 1.1.1 *KLEBSIELLA SPP.*

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην ομάδα των Εντεροβακτηριακών που ζυμώνουν τη λακτόζη. Περιλαμβάνει τα είδη *K. pneumoniae spp.*, *K. pneumoniae spp aerogenes*, *K. pneumoniae spp. ozaenae*, *K. pneumoniae spp.rhinoscieromatis* και *K. oxytoca*.

Τα είδη του γένους μπορούν να διαφοροποιηθούν με απλές βιοχημικές δοκιμασίες. Όλα τα είδη έχουν τους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των εντεροβακτηριακών. Διαχωριστικοί χαρακτήρες του γένους θεωρούνται η παρουσία του ελύτρου πολυσακχαραδικής φύσεως που κάνει τις αποικίες του μικροοργανισμού βλενώδεις, η έλλειψη βλεφαρίδων που το κάνει ακίνητο και η αδυναμία υδρόλυσης της ορνιθίνης, την οποία υδρολύουν όλα τα άλλα γένη των εντεροβακτηριακών. Τυπικό είδος του γένους είναι η *Klebsiella pneumoniae spp.pneumoniae*.<sup>7</sup>

#### **Μορφολογία**

Το γένος *Klebsiella* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια μήκους 1-2 μm και πάχους 0,5-0,8 μm. Τα βακτηρίδια διατάσσονται μονά ή κατά ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Δεν έχουν βλεφαρίδες και περιβάλλονται από έλυτρο. Φέρουν ινίδια, δεν έχουν σπόρους, είναι αερόβια και προαιρετικά αναερόβια.<sup>7</sup>

#### **Φυσιολογία-Μεταβολισμός**

Τα βακτηρίδια του γένους *Klebsiella* έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C, με όρια από 12 έως 43 °C. Καταστέφονται στους 55 °C μετά από 30' ενώ επιβιώνουν στην ξηρασία για μήνες.

Αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά. Στο θρεπτικό άγαρ οι αποικίες είναι μεγάλες, βλενώδεις και έχουν χρώμα γκριζόλευκο. Εκλεκτικό θρεπτικό υλικό είναι το Mac Conkey άγαρ στο οποίο αναπτύσσονται μεγάλες χαρακτηριστικά βλενώδεις και χρώματος ροζ αποικίες.<sup>7</sup>

## Παράγοντες παθογένειας

Η άμυνα του ξενιστή ενάντια στην είσοδο του βακτηρίου βασίζεται στη φαγοκυττάρωση του από πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Τα βακτήρια ξεπερνούν το ενδογενές αμυντικό σύστημα του ξενιστή με διάφορους τρόπους. Διαθέτουν μία κάψα από πολυσακχαρίτες η οποία είναι καθοριστικός παράγοντας της παθογένειάς τους. Η κάψα συντίθεται από ένα σύμπλεγμα όξινων πολυσακχαριτών. Το στρώμα αυτό προστατεύει το βακτήριο από την φαγοκυττάρωση από τα πολυμορφοπύρηνα και αποτρέπει το βακτηριακό θάνατο μέσω παραγόντων του ορού. Ακόμα, τα βακτήρια είναι ικανά να παράγουν προσκολλητίνες. Αυτές οι δομές βοηθούν το βακτηριακό κύτταρο να προσκολληθεί στα κύτταρα του ξενιστή, διαδικασία καθοριστικής σημασίας για τη διαδικασία της λοίμωξης. Οι λιποπολυσακχαρίτες αποτελούν άλλον ένα παράγοντα παθογένειας. Έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα. Επίσης, τα βακτήρια ανταγωνίζονται αποτελεσματικά το σίδηρο που είναι δεσμευμένος με τις πρωτεΐνες του ξενιστή με τη βοήθεια χηλικών παραγόντων, υψηλής χημικής συγγένειας και μικρού μοριακού βάρους, των μεταφορέων σιδήρου.

### 1.1.2 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE SPP. PNEUMONIAE*

#### Αντιγονική δομή

Η *K. pneumoniae spp. pneumoniae* έχει το σωματικό αντιγόνο (O) και το αντιγόνο του ελύτρου (K). Έχουν περιγραφεί 5 σωματικά αντιγόνα και 80 αντιγόνα του ελύτρου. Τα 4 εκ των 5 σωματικών είναι όμοια και σχετίζονται με τα αντιγόνα της *E.coli*. Τα αντιγόνα K1-K6 απαντώνται συχνότερα σε στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος στον άνθρωπο.<sup>7</sup>

#### Οικολογία – επιδημιολογία

Οι άνθρωποι αποτελούν τη βασική δεξαμενή της *K. pneumoniae*. Η *K. pneumoniae* απομονώνεται στο 5%-38% των κοπράνων και στο 1%-6% του οροφάρυγγα στους φορείς του μικροβίου, ενώ σπάνια απομονώνεται από το δέρμα.<sup>8</sup>

Τα ποσοστά φορέας είναι ιδιαίτερα αυξημένα στους νοσοκομειακούς ασθενείς. Συγκεκριμένα, το μικρόβιο απομονώνεται στο 77% σε δείγματα κοπράνων, στο 19% στο φάρυγγα και στο 42% στα χέρια των ασθενών.<sup>8</sup> Τα υψηλότερα ποσοστά αποικισμού σχετίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών.<sup>8,8,10</sup> Σε μία νοσοκομειακή λοίμωξη από *K.*

*pneumoniae* οι νοσούντες φορείς του μικροβίου ήταν 4 φορές περισσότεροι από τους μη-φορείς.<sup>11</sup> Η *K. pneumoniae* ανευρίσκεται στο νερό και στο έδαφος.<sup>12-14</sup>

Τα νοσοκομειακά στελέχη παρουσιάζουν συνήθως πολυαντοχή στα αντιβιοτικά η οποία είναι και πλασμιδιακή. Θεωρούνται ως πηγή διασποράς των γόνων αντοχής σε άλλα νοσοκομειακά μικρόβια.<sup>7</sup>

Επίσης σε μία μελέτη διαπιστώνεται αυξημένη εμφάνιση μικροβιαμιών από *K. pneumoniae* τους θερμούς μήνες του έτους σε 4 ηπείρους το οποίο υποδηλώνει πιθανή εποχιακή κατανομή της λοίμωξης από *K. pneumoniae*.<sup>15</sup>

### **Τόπος εμφάνισης της λοίμωξης**

Λοιμώξεις από *K. pneumoniae* συνήθως εμφανίζονται στα νοσοκομεία, σε κέντρα αποκατάστασης, σε οικους ευγηρίας και λιγότερο συχνά στην κοινότητα.<sup>8,10,17,19,22-24,27</sup> Η *K. pneumoniae* συνιστά το 3%-8% των βακτηριακών νοσοκομειακών λοιμώξεων με πιο συνήθεις τις ουρολοιμώξεις, τις πνευμονίες και τις μικροβιαμιές.<sup>8,28</sup> Η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών και η χρήση επεμβατικών πλαστικών συσκευών όπως ουρητηρικοί κάθετηρες, ενδοτραχειακοί σωλήνες και ενδοφλέβιοι καθετήρες αποτελούν παράγοντες προδιάθεσης για την εμφάνιση νοσοκομειακών λοιμώξεων.<sup>8,10,23</sup> Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών είναι άλλωστε υπεύθυνη για την ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae*.

### **Παράγοντες κινδύνου του ξενιστή**

Τα ποσοστά λοίμωξης από *K. pneumoniae* είναι αυξημένα σε ασθενείς με έκπτωση των αμυντικών μηχανισμών (π.χ. σακχαρώδης διαβήτης, αλκοολισμός, κακοήθεια, ηπατοπάθειες, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, κορτικοειδή και νεφρική ανεπάρκεια).<sup>16-26</sup> Σε μία σειρά 101 ασθενών με βακτηριαιμία από *K. pneumoniae*, το 36% είχε σακχαρώδη διαβήτη και το 26% είχε κακοήθεια.<sup>19</sup>

### **Λοιμογόνοι παράγοντες – Παθογένεια**

Κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες της *K. pneumoniae* που συμβάλλουν στην παθογένεια είναι οι ορότυποι της κάψας, ο φαινότυπος αυξημένης παραγωγής βλεννοπυώδους εκκρίματος, η λιποπολυσακχαρίδη, οι μεταφορείς σιδήρου και τα ινίδια (εικ. 1).<sup>29</sup>

- **Ορότυποι με βάση το αντιγόνο της κάψας.**



Τα αντιγόνα του πολυσακχαρίτη της κάψας της *K. pneumoniae* μπορούν να ταξινομηθούν σε 77 ορότυπους. Ο ορότυπος που κυριαρχεί ποικίλλει ευρέως σε διάφορες περιοχές.<sup>30-37</sup> Παγκοσμίως, το K2 είναι ο πιο κοινός ορότυπος που προσβάλλει τον άνθρωπο (απομονώνεται συνήθως από τα ούρα ή πτύελα).<sup>30</sup> Ωστόσο, σε διαφορετικές σειρές, οι ορότυποι 2, 21 και 55 είναι πιο κοινοί στην Ευρώπη,<sup>30</sup> και αντίστοιχα με σειρά συχνότητας οι 21, 2, και 55 στη Βόρεια Αμερική.<sup>30</sup>

Ο K1 ήταν ο κυρίαρχος ορότυπος της κάψας σε περιστατικά βακτηριαμίας, ηπατικών αποστημάτων και σηπτικών ενδοφθαλμίτιδων στην Ταϊβάν<sup>31-34</sup> όπως και σε περιπτώσεις ηπατικών αποστημάτων στην Κορέα<sup>35</sup> ενώ ο K54 ήταν ο κύριος ορότυπος που απομονώθηκε σε ούρα, πτύελα και αίμα κλινικών περιστατικών στην Αυστραλία.<sup>36</sup>

Το στελέχη K1 και K2 είναι περισσότερο λοιμογόνα από τα μη -K1 / K2 στελέχη και υψηλότερης θνησιμότητας κατά την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε ποντίκια.<sup>38</sup> Οι διαφορές ως προς το βαθμό της λοιμογόνου δυνάμεως που παρατηρήθηκε μεταξύ στελεχών με διαφορετικούς τύπους κάψας μπορεί να εξηγηθεί από δύο κύριους μηχανισμούς:

1) Τα μακροφάγα με υποδοχείς λεκτίνης ή μαννόζης μπορούν να αναγνωρίσουν τις πολυσακχαριδικές αλληλουχίες της βακτηριακής κάψας: μαννόζη - άλφα - 2/3 - μαννόζη ή L- ραμνόζη - άλφα - 2/3 - L - ραμνόζη, ιδιαίτερα των οροτύπων μη -K1 / K2. Η φαγοκυττάρωση δια των μακροφάγων αυτών των στελεχών γίνεται χωρίς τη μεσολάβηση οψονίνων και ονομάζεται λεκτινοφαγοκύτωση.<sup>39,40</sup> Τα στελέχη K1 ή K2 δε διαθέτουν αυτές τις πολυσακχαριδικές αλύσους (με μαννόζη ή ραμνόζη) το οποίο τους παρέχει προστασία από την επακόλουθη φαγοκύτωση.<sup>41,42</sup>

2) Τα στελέχη *K. pneumoniae* με αντιγόνο κάψας K1 ή K2 εμφανίζουν αυξημένη προσκολλητικότητα στους βλεννογόνους από τα στελέχη μη -K1/K2.<sup>33</sup>

Μερικοί ορότυποι όπως οι K1, K2, και K25 προκαλούν λοίμωξη στον ξενιστή προστατεύοντας τον οργανισμό από τα ουδετερόφιλα.<sup>42,43</sup> Επιπρόσθετα, το πολυσακχαριδικό αντιγόνο της κάψας συμβάλλει στην εμφάνιση αναπνευστικής λοίμωξης προστατεύοντας το βακτήριο από τα κυψελιδικά μακροφάγα.<sup>44</sup>

### ➤ Ο φαινότυπος αυξημένης παραγωγής βλεννοπυώδους εκκρίματος. (Hypermucoviscosity phenotype).

Ο συγκεκριμένος φαινότυπος αφορά στα ικανά στελέχη για παραγωγή ενός βλεννοπυώδους εξωπολυσακχαριδικού πλέγματος. Στο μικροβιολογικό εργαστήριο τα στελέχη αυτά σχηματίζουν κολλώδεις αποικίες και ταυτοποιούνται με το string test.<sup>45</sup> Θετικό string test θεωρείται η εμφάνιση >5 mm κολλώδους χορδής κατά την εφαρμογή και ανύψωση ενός μικροβιολογικού βρόχου επί της αποικίας που αναπτύσσεται σε

καλλιεργητικό υλικό άγαρ.<sup>46</sup> Τα κλινικώς διεισδυτικά και υψηλής μολυσματικότητας στελέχη συσχετίζονται με αυτά τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά.

Τα στελέχη με αυτό τον φαινότυπο (hypermucoviscosity phenotype) ή με αυξημένη παραγωγή πολυσακχαριδικού υλικού της κάψας ανεξάρτητα των οροτύπων του K καψικού αντιγόνου είναι πιο ανθεκτικά στην δια του συμπληρώματος μεσολαβούμενη φαγοκύττωση από τα στελέχη που δεν ανήκουν σε αυτόν τον φαινότυπο ή έχουν ελλειπόμενη παραγωγή πολυσακχαριδικού υλικού στην κάψα.<sup>46,47</sup> Η κλινική σημαντικότητα αυτών παρατηρήσεων διαφαίνεται σε μια μελέτη στην οποία η αυξημένη παραγωγή βλεννώδους υλικού σχετίζεται με αυξημένη ανθεκτικότητα στη φαγοκύττωση και ήταν παρούσα σε 52 από 53 στελέχη που προκάλεσαν διεισδυτική λοίμωξη (ηπατικό απόστημα) συγκριτικά με 9 σε 52 περιπτώσεις μη διεισδυτικών λοιμώξεων.<sup>46</sup>

Αυτές οι συσχετίσεις επιβεβαιώνονται σε μια ανάλυση 151 στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από περιστατικά βακτηριαιμίας:<sup>48</sup>

- Ο φαινότυπος HV (hypermucoviscosity phenotype) βρέθηκε στο 38% των περιπτώσεων.
- Οι πλείστες των περιπτώσεων αφορούσαν δευτεροπαθείς βακτηριαιμίες από αποστηματικές κοιλότητες (υψηλής διεισδυτικότητας λοιμώξεις) ενώ ήταν λίγες οι περιπτώσεις απομόνωσης τέτοιων στελεχών από βακτηριαιμίες πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς από μη-αποστηματοποιημένες περιοχές.

Η εξωτερική στοιβάδα της κάψας της *K. pneumoniae* συνίσταται από ένα δίκτυο ινικής προερχόμενο από πολυσακχαρίτη της κάψας<sup>49</sup>, γνωστό ως πλέγμα εξωπολυσακχαρίδης. Αυτή η δομή κωδικοποιείται από συγκεκριμένο γονίδιο (cps)<sup>50</sup> και ρυθμίζεται δια της μεσολάβησης πλασμιδίου από γονίδια, όπως το rmpA (ρυθμιστής του mucoid phenotype gene A)<sup>50-52</sup>, rmpA2<sup>53,54</sup> and magA (mucoid associated gene A).<sup>46</sup>

### ➤ Λιποπολυσακχαρίδη

Η πλάγια Ο αλυσος πολυσακχαρίδης της *K. pneumoniae* αποτρέπει την προσκόλληση των στοιχείων c1q ή c3b του συμπληρώματος στη βακτηριακή μεμβράνη εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη δια του συμπληρώματος κυτταρική λύση.<sup>56-59</sup> Σε μεταλλαγμένα στελέχη με απουσία της συγκεκριμένης αλυσος διαπιστώνεται ευαισθησία στη λύση του βακτηρίου από τα στοιχεία του συμπληρώματος.<sup>56,57</sup> Ο ορότυπος της κάψας σε αυτά τα στελέχη δεν επηρεάζει την ανθεκτικότητα απέναντι στο συμπλήρωμα. Η λιποπολυσακχαρίδη μπορεί να συμβάλλει στην αυξημένη λοιμογόνο δύναμη ενός στελέχους και με άλλους τρόπους, όπως αύξηση της θνησιμότητας σε πνευμονική λοίμωξη με συνοδό αύξηση του ποσοστού

βακτηριαμίας<sup>60</sup>, όπως και η δράση ως ενδοτοξίνη με ενεργοποίηση δια μέσου κυτοκινών, δρόμων οδηγώντας σε σήψη και σηπτικό shock.

### ➤ **Μεταφορείς Σιδήρου**

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη εντεροβακτηριακών όπως η *K. pneumoniae*.<sup>61</sup> Λόγω της έλλειψης σιδήρου από το περιβάλλον η *K. pneumoniae* έχει αναπτύξει μηχανισμούς για να αυξήσει την πρόσληψη σιδήρου, συνθέτει μεταφορείς σιδήρου, όπως η εντεροβακτίνη και η αερομπακτίνη,<sup>61-63</sup> τον υποδοχέα αεροβακτίνης,<sup>64</sup> και το kfu σύστημα πρόσληψης σιδήρου.<sup>55</sup>

Η εντεροβακτίνη συντίθεται από όλα σχεδόν τα στελέχη *K. pneumoniae*.<sup>65-67</sup> Σε αντίθεση η σύνθεση αερομπακτίνης δεν συναντάται συχνά (λιγότερο από 10% των στελεχών).<sup>65-68</sup> Σε μια μελέτη 9 στελεχών *K. pneumoniae* με ορότυπο K1 ή K2, όλα παρήγαγαν εντεροβακτίνη, αλλά μόνο όσα στελέχη παρήγαγαν αερομπακτίνη είχαν ισχυρή λοιμογόνο δύναμη.<sup>63</sup>

Τόσο η αερομπακτίνη όσο και το γονίδιο *rmpA*, σχετίζονται σημαντικά με τον HV φαινότυπο και εντοπίζονται σε ένα πλασμίδιο 180-κιλοβάσεων.<sup>52</sup> Σε μια έρευνα 241 στελεχών που απομονώθηκαν σε αίμα το 6% που παρήγαγε αερομπακτίνη συσχετιζονταν με το φαινότυπο HV.<sup>68</sup> Ωστόσο, ένα 20% των στελεχών είχαν το HV φαινότυπο. Συμπερασματικά, το γονίδιο της αερομπακτίνης συσχετιζονταν πάντα με το γονίδιο *rmpA*, ενώ το αντίθετο δε συνέβαινε. Άρα η συσχέτιση της αερομπακτίνης με την αυξημένη λοιμογόνο δύναμη διαμεσολαβείται από τη συνύπαρξη του HV φαινότυπου. Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαιώθηκε σε σειρά πειραμάτων με K2 στελέχη *K. pneumoniae*.<sup>52</sup> RmpA-αρνητικά μεταλλαγμένα στελέχη ήταν 1000 φορές λιγότερο λοιμογόνα από «άγριους» οροτύπους αλλά 100 φορές πιο λοιμογόνα από στελέχη *rmpA*-αρνητικά και ανίκανα για παραγωγή αερομπακτίνης.

### ➤ **Ινίδια**

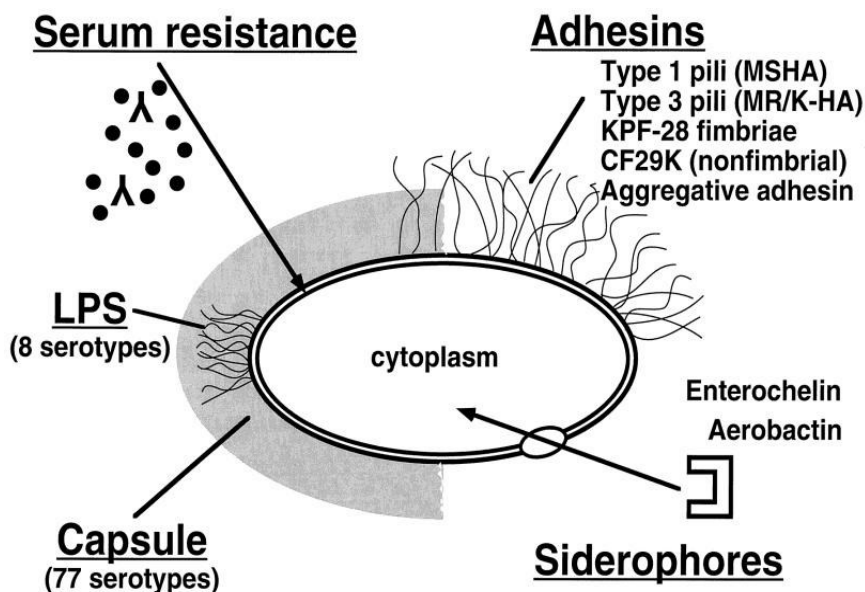
Η *K. pneumoniae* εκφράζει δύο διαφορετικούς μορφολογικά και λειτουργικά τύπους ινιδίων :

- Όλα τα εντεροβακτηριακά παράγουν τον τύπο 1 ινιδίων που διευκολύνει την προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα όπως το επιθήλιο της ουροδόχου κύστης. Σε

μελέτη 151 *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από αίμα ο τύπος 1 ινιδίων ήταν παρών στο 98% των στελεχών.<sup>48</sup>

•Ο τύπος 3 ινιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη της (MrkD adhesin) *K. pneumoniae*. Το στέλεχος προσκολλάται στα κύτταρα του ξενιστή στη ουρογεννητική, αναπνευστική και πεπτική οδό και προκαλεί αντίστοιχα αποικίες, ταχύ πολλαπλασιασμό και λοιμώξεις.<sup>69</sup> Οι συγκεκριμένες βλεφαρίδες είναι απαραίτητες για τη δημιουργία biofilm από την *K. pneumoniae* σε πλαστική ύλη και σε ανθρώπινο εξωκυττάριο υλικό οδηγώντας στη δημιουργία αποικιών ανθεκτικών στη θεραπεία σε πλαστικές συσκευές όπως ενδοφλέβιοι και ουρητηρικοί καθετήρες.<sup>70,71</sup>

Ωστόσο ο ξενιστής με ποικίλους μηχανισμούς αντιμετωπίζει αυτή τη δράση της *K. pneumoniae*. Η προσκόλληση των μικροβίων στους βλεννογόνους ή στο επιθηλιακό ιστό ενεργοποιεί τα μακροφάγα προς φαγοκυττάρωση.<sup>39,40</sup> Η είσοδος των μικροβίων στην κυκλοφορία του αίματος ενεργοποιεί το συμπλήρωμα. Η επιβίωση και η ανάπτυξη των ισχυρά παθογόνων και λοιμογόνων βακτηρίων απαιτεί την παρουσία πέρα των ινιδίων και των προαναφερόμενων λοιμογόνων παραγόντων.



Εικόνα 1 : Σχηματική απεικόνιση λοιμογόνων παραγόντων *Klebsiella pneumoniae*.

Η διασπορά στελεχών που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (ESBL) είναι μια παγκόσμια πραγματικότητα.

Η KPF-28 προσκολλητίνη έχει βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό ESBL-στελεχών.<sup>72</sup> Η KPF-28 προωθεί την προσκόλληση και τον εντερικό αποικισμό των ESBL-στελεχών αυξάνοντας την πιθανότητα έξαρσης ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων.

Πέραν της προσκολλητίνης, τα ESBL-στελέχη *K. pneumoniae* παρουσιάζουν σε μικρό ποσοστό τους προαναφερόμενους παράγοντες λοιμογόνους δύναμης όπως ο HV φαινότυπος ή η αερομπακτίνη. Σε μια μελέτη 190 ESBL-στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν σε περιστατικά στη Γαλλία μόνο 7% είχαν τον HV φαινότυπο, 4 % παρήγαγαν αεροβακτίνη και 2% είχαν και τους δύο παράγοντες.<sup>73</sup>

Η μικρή παρουσία αυτών των παραγόντων λοιμογόνου δύναμης αποδεικνύει ότι τα στελέχη ESBL *K. pneumoniae* ίσως έχουν ελαττωμένη τοξικότητα.

- Στην Ταιβάν η παρουσία ESBL- *K. pneumoniae* δε συσχετίστηκε με την δημιουργία πρωτοπαθών ηπατικών αποστημάτων.<sup>74,75</sup> Οι λοιμώξεις ήταν κυρίως νοσοκομειακές<sup>74</sup>, που σπάνια προκαλούν τη δημιουργία ιστικών αποστημάτων ίσως λόγω της μικρής παρουσίας του HV φαινοτύπου (15 % έναντι 49 % στις λοιμώξεις της κοινότητας).<sup>48</sup>

- Σε μια ανάλυση μελετών από πέντε Ευρωπαϊκές χώρες, τα ESBL-στελέχη *K. pneumoniae* έχουν σημαντικά υψηλότερη αντίσταση στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού από μη ESBL-στελέχη (30% έναντι 18 %).<sup>76</sup> Σε μετανάλυση που ακολούθησε, τα ESBL-στελέχη είχαν κυρίως τον ορότυπο K2 (ο ορότυπος K1 ήταν σπάνιος).<sup>43</sup> Μετά τον αποκλεισμό των K1/K2 στελεχών που συσχετίζονται με τον HV φαινότυπο, τα ποσοστά αντοχής στις πρωτείνες του ορού ήταν παρόμοια στα ESBL- και μη-ESBL-στελέχη. Η αιτία της ανθεκτικότητας στην βακτηριοκτόνο δράση του ορού δεν είναι πλήρως κατανοητή δεδομένου της σπάνιας παρουσίας του HV φαινοτύπου και της αερομπακτίνης στην Ευρώπη, της μη ξεκάθαρης συσχέτισης με τον ορότυπο της λιποπολυσακχαρίδης O<sup>76</sup>, και τη μη συμμετοχή του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την παραγωγή ESBL.<sup>76</sup>

### Παθογόνος δράση

Η *K. pneumoniae* προκαλεί βαρύ τύπο πνευμονίας, την πνευμονία Friedlander, που χαρακτηρίζεται από σπηλαιοποίηση του πνεύμονα με πτύελα βλενώδη αιματηρά. Ενίοτε προκαλεί δευτερογενείς λοιμώξεις του πνεύμονα σε άτομα που πάσχουν από φυματίωση, βρογχίτιδα ή γρίππη. Επίσης, μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα, ωτίτιδα και κολπίτιδα. Η πρόγνωση της πνευμονίας είναι βαριά ιδίως σε αλκοολικούς. Προκαλείται από τους τύπους K- 1,2 και 3.

Η *K. pneumoniae* είναι το δεύτερο κατά σειρά μετά την *E. coli* αίτιο ουρολοιμώξεων, οι οποίες υποτροπιάζουν αν δεν υποβληθούν σε σωστή θεραπεία. Η λοίμωξη είναι σχεδόν πάντοτε ανιούσα, εκτός της νεογνικής. Είναι η συχνότερη αιτία ουρολοιμώξεων στους

νεφρολιθιασικούς και σε ασθενείς που έχουν άλλη νόσο που προκαλεί στάση ή απόφραξη στο ουροποιητικό. Επίσης είναι πολύ συχνή σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κυστεοσκόπηση ή καθετηριασμό.

Εκτός των παραπάνω κλινικών εκδηλώσεων η *K. pneumoniae* αναφέρεται επίσης ως αίτιο νεκρωτικής εντεροκολίτιδας, μηνιγγίτιδας και νεογνικής σηψαιμίας στα νεογνά.<sup>7</sup>

### **Ευαισθησία στα αντιβιοτικά - Θεραπεία**

Τα κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* έχουν σχεδόν πάντα φυσική αντοχή στις πενικιλίνες. Είναι όμως συνήθως ευαίσθητα στις κεφαλοσπορίνες και ιδιαίτερα στα νεώτερα παράγωγα κεφουροξίμη και κεφοταξίμη. Συχνά τα στελέχη είναι ευαίσθητα στη γενταμυκίνη. Η αντοχή στη χλωραμφαινικόλη και την τετρακυκλίνη διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος.

Εύκολα μολύνεται από παράγοντες αντοχής. Στα περισσότερα νοσοκομειακά στελέχη αναπτύσσεται πλασμιδιακή αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, τις μονομπακτάμες και στις διάφορες κεφαλοσπορίνες.<sup>7</sup>

Τα είδη *K. pneumoniae* είναι η κυριότερη δεξαμενή πλασμιδιακών ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBLs) στα νοσοκομεία διεθνώς. Η παρουσία αυτών των ενζύμων πρέπει πάντα να ελέγχεται, ενώ η ερμηνεία του αντιβιογράμματος και η επιλογή αντιβιοτικού για τη θεραπεία λοιμώξεων από αυτούς τους μικροοργανισμούς πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά. Επιπλέον από το 2003 παρατηρήθηκαν στις ΜΕΘ των ελληνικών νοσοκομείων επιδημίες από στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1. Από το 2008 παρατηρήθηκε διασπορά στελεχών με καρβαπενεμάση τύπου KPC σε πολλά νοσοκομεία. Γενικώς, συνιστάται θεραπευτικά η αποφυγή των καρβαπενεμών. Για τη θεραπεία λοιμώξεων από στελέχη που παράγουν KPC ή VIM καρβαπενεμάσες (επιβεβαιωμένα ή ύποπτα) προτείνεται: 1) εάν η MIC στην ιμιπενέμη είναι >4μg/ml να μην χορηγείται καμία καρβαπενέμη (περιλαμβανομένης και της και της ντοριπενέμης) και αναλόγως να δίνεται τιγκεκυκλίνη ή κολιστίνη, 2) εάν η MIC ≤4μg/ml συνιστάται συνδυασμός της μεροπενέμης στη μεγαλύτερη δυνατή δόση (6-8 gr/24h) με γενταμικίνη (ή άλλη αμινογλυκοσίδα σύμφωνα με το αντιβιογράμμα) ή, επί αντοχής στις αμινογλυκοσίδες, με κολιστίνη.<sup>5</sup>

## 1.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Τα περισσότερα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι σαπρόφυτα και συναντώνται ευρέως στη φύση, στο έδαφος, στο νερό, στη θάλασσα, στα λύματα και στον αέρα.

Οι μοριακές αναλύσεις έχουν αναθεωρήσει την ταξινόμησή τους και πολλά είδη έχουν κατανεμηθεί σε νέα γένη όπως *Bukholderia*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas* και *Brevundimonas*.

Η *P. aeruginosa* είναι το πλέον συνηθισμένο είδος, που συνδέεται με λοιμώξεις στον άνθρωπο και συχνά συμπεριφέρεται ως ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο σε εξασθενημένα άτομα ή ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.<sup>7</sup>

### Μορφολογία

Η *P. aeruginosa* είναι Gram αρνητικό ραβδοειδές βακτήριο, άσπορο, ελυτροφόρο, συνήθως κινητό, με μία ή περισσότερες βλεφαρίδες στους πόλους.<sup>7</sup>

### Φυσιολογία-μεταβολισμός

Είναι αποκλειστικά αερόβιο μικρόβιο. Γι' αυτό αναπτύσσεται στην επιφάνεια του θρεπτικού ζωμού, σχηματίζοντας ένα υμένιο. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 25-42<sup>0</sup> C, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της *P. aeruginosa* είναι η παραγωγή οξειδάσης.

Ο μικροοργανισμός παράγει τρεις διαφορετικές χρωστικές:

**A)** Πυοκυανίνη, η οποία έχει την ικανότητα να καταλύει το ανηγμένο νικοτινοάμιδοαδενινουκλεοτίδιο (NADH), από το οποίο εξαρτάται η μετατροπή του οξυγόνου σε υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η παρουσία του υπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων και προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Η πυοκυανίνη χρωματίζει μπλε τα πυύδη εκκρίματα των μολύνσεων που προκαλούνται από την *P. aeruginosa*.

**B)** Πυοβερνίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για το πράσινο χρωματισμό του άγαρ όπου καλλιεργείται το μικρόβιο.

**Γ)** Φλουοροσεΐνη, η οποία χρωματίζει φθορίζουσες πράσινες τις αποικίες, όταν εξετάζονται κάτω από το υπεριώδες φως.<sup>7</sup>

## Αντιγονική δομή

Ο λιποπολυσακχαρίτης του μικροοργανισμού (Ο σωματικό αντιγόνο) αποτελεί τη βάση για την ορολογική διάκριση του μικροοργανισμού. Σε περιπτώσεις που η μεταβλητή σακχαρική αλυσίδα ελλείπει, όπως σε στελέχη που απομονώνονται από πνευμονικές λοιμώξεις, κυστική ίνωση, τα στελέχη δεν αντιδρούν με τους αντιορούς ή δεν αντιδρούν με πολλούς αντιορούς και χαρακτηρίζονται ως αταυτοποίητα.<sup>7</sup>

## Οικολογία - επιδημιολογία

Η ευρεία διασπορά και η ικανότητα της *P. aeruginosa* να επιζεί και να πολλαπλασιάζεται σε υγρό περιβάλλον και η αντοχή της στα αντισηπτικά και αντιβιοτικά ευθύνεται για την υψηλή συχνότητα των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Έχει απομονωθεί στα νοσοκομεία, από μονάδες εντατικής θεραπείας, μπάνια, κουζίνες, νιπτήρες, τουαλέτες, σκούπες κ.α.

Οι νοσηλεύόμενοι ασθενείς μπορούν να μολυνθούν με πολλούς τρόπους όπως τροφή, άπλυτα χέρια, αναπνευστικές συσκευές, καθετήρες, συσκευές νάρκωσης, όργανα κυστεοσκόπησης, όργανα βρογχοσκόπησης κ.α.

Ασθενείς με κυστική ίνωση, νεοπλάσματα, ουδετεροπενία, βαριά εγκαύματα, άτομα που θεραπεύονται με αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά είναι ευπαθείς και προσβάλλονται συχνά από λοίμωξη προκαλούμενη από *P. aeruginosa*.<sup>7</sup>

## Λοιμογόνοι παράγοντες - Παθογένεια

A) Αλγινικό έλυτρο. Μερικά στελέχη *P. aeruginosa* παράγουν ένα αλγινικό έλυτρο, που σχηματίζεται από ένα πολυμερές του μαννουρονικού και γλυκουρονικού οξέος και έχουν μια βλεννώδη εμφάνιση. Το αλγινικό έλυτρο είναι σημαντικό για την επιβίωση σε υδατικό περιβάλλον, αλλά επίσης παράγεται από στελέχη που μολύνουν τους πνεύμονες στην κυστική ίνωση.

Πιστεύεται ότι το αλγινικό έλυτρο λειτουργεί και ως παράγοντας προσήλωσης και ως αντιφαγοκυτταρικός παράγοντας.

B) Προσκολλησίνες. Είναι ουσιώδεις για τον αρχικό αποικισμό των επιθηλίων.

Γ) Αιμολυσίνες. Περιλαμβάνουν τη φωσφολιπάση C, που μπορεί να ελαττώσει την επιφανειακή τάση των ιστών και να προκαλέσει πνευμονική ατελεκτασία.

Δ) Πρωτεάσες. Περιλαμβάνει την ελαστάση, που προκαλεί πέψη των πρωτεϊνών και καταστροφή των ιστών.



Ε) Τοξίνες. Αναφέρονται α) λιποπολυσακχαρίτες (ΛΠΣ, ενδοτοξίνες), β) εντεροτοξίνη και γ) δύο εξωτοξίνες, εξωτοξίνη S και εξωτοξίνη A.

Η εξωτοξίνη A ελευθερώνεται από το 90% περίπου των στελεχών που απομονώνονται και είναι η πιο σημαντική εξωτοξίνη της *P. aeruginosa*. Η εξωτοξίνη A έχει δράση ADP-ριβοσυλο-τρανσφεράσης και αδρανοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης (EF-2) του πεπτιδίου, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Η εξωτοξίνη S ελευθερώνεται από το 40% περίπου των στελεχών και έχει δράση ADP-ριβοσυλάσης επί των G πρωτεϊνών του κυττάρου του ξενιστή. Πιστεύεται ότι και οι δύο εξωτοξίνες αναστέλλουν τη φαγοκυτταρική δράση.

Στ) Η αντοχή στα αντιβιοτικά οφείλεται στη μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Δραστικά αντιβιοτικά μεταφέρονται διαμέσου των πορινών με διάχυση ή κατόπιν σύνδεσης με τις πλευρικές αλυσίδες των ΛΠΣ. Έτσι, οι μεταλλαγές που αφορούν τις πορίνες και τον μηχανισμό σύνθεσης των πλάγιων αλυσίδων των ΛΠΣ συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά.

Η *P. aeruginosa* συχνά προκαλεί ευκαιριακές νοσοκομειακές λοιμώξεις σε άτομα με προδιάθεση (εκτεταμένα εγκαύματα, τραύματα του δέρματος ή του επιπεφυκότα, χειρουργικές επεμβάσεις στο ουροποιητικό σύστημα και κυστική ίνωση). Η λοίμωξη εντοπίζεται στην περιοχή της βλάβης αλλά η βακτηριαιμία οδηγεί συχνά σε διασπορά του μικροβίου σε απομακρυσμένες εστίες και σήψη. Η αποκλειστική συσχέτιση της *P. aeruginosa* με την κυστική ίνωση έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικών ερευνών.

Η αυξημένη ικανότητα της *P. aeruginosa* να αποικίζει τους ασθενείς με κυστική ίνωση φαίνεται να οφείλεται :

α) Στην υψηλή περιεκτικότητα σε σιαλικό οξύ των βλεννοπεπτιδίων σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Δρουν ενισχυτικά στην προσήλωση του μικροοργανισμού επί των βλεννογόνων που καλύπτονται από βλεννίνη.

β) Στην έκφραση των γαγγλιοσίδων (aGM1) που λειτουργούν ως υποδοχείς για την *P. aeruginosa* στο αναπνευστικό επιθήλιο.

γ) Στην καταστροφή του επιθηλίου των βλεννογόνων από πρωτεάσες, οι οποίες απελευθερώνονται ή από το μικροοργανισμό ή από τα προσβεβλημένα κύτταρα.

Επίσης η αυξημένη λοιμογόνος δύναμη της *P. aeruginosa*, που απομονώνεται από ασθενείς με κυστική ίνωση, οφείλεται στην παραγωγή υψηλότερων επιπέδων εξωτοξίνης A. Τα στελέχη που προκαλούν χρόνιες λοιμώξεις εμφανίζουν ένα καλά ανεπτυγμένο αλγινικό έλυτρο που αυξάνει την αντοχή στη φαγοκυττάρωση.<sup>7</sup>

## Παθογόνος δράση

Η *P. aeruginosa* είναι μικρόβιο που προσβάλλει πολλά όργανα. Ανάλογα με την πύλη εισόδου μπορεί να προκαλέσει:

1. Διαπυήσεις τραυμάτων και εγκαύματα. Η μόλυνση των εγκαυμάτων από *P. aeruginosa* ακολουθείται από καταστροφή των αγγείων στην περιοχή της βλάβης και νέκρωση του ιστού.
2. Ουρολοιμώξεις. Ο μικροοργανισμός πολύ συχνά προκαλεί λοιμώξεις στο ουροποιητικό σύστημα σε νοσοκομειακούς ασθενείς. Αναπτύσσονται μετά από επεμβάσεις στο ουροποιητικό σύστημα, όπως καθετηριασμό, κυστεοσκόπηση, εγχειρήσεις.
3. Ωτίτιδες. Ο μικροοργανισμός μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις του έξω και μέσου ωτός σε υγιή παιδιά. Επίσης συχνά προκαλεί εξωτερικές ωτίτιδες (κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα) σε κολυμβητές, δύτες και άτομα που χρησιμοποιούν πισίνες.
4. Λοιμώξεις του οφθαλμού. Συνήθως είναι επιπεφυκίτιδες ή δακρυοκυστίτιδες και αναπτύσσονται μετά από τραύματα, χειρουργικές επεμβάσεις ή μετά τη χρήση φακών επαφής. Οι φλεγμονές αυτού του είδους μπορεί να οδηγήσουν σε ταχεία καταστροφή του κερατοειδούς ή και των βλαβών.
5. Λοιμώξεις των οστών (οστεομυελίτιδες) και των αρθρώσεων (σηπτική αρθρίτιδα). Παρατηρούνται κυρίως σε τοξικομανείς, σε ασθενείς που υφίστανται αιμοδιάλυση ή σε άτομα που έχουν υποστεί καθετηριασμό της υποκλειδίου.
6. Σηψαιμία. Σε βρέφη που πάσχουν από βαριά γενική νόσο, σε εξασθενημένους ενήλικες ή καρκινοπαθείς η *P. aeruginosa* μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία και να προκαλέσει θανατηφόρο σηψαιμία.

Η *P. aeruginosa* ευθύνεται για το 10% όλων των Gram αρνητικών συστηματικών λοιμώξεων και συνδέεται με το 50% της θνητότητας.<sup>7</sup>

## Διάγνωση

Η διάγνωση των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* απαιτεί καλλιέργεια, απομόνωση και ταυτοποίηση του μικροβίου. Με τη λυσιτυπία και κυρίως με την οροτυπία και πυοσινοτυπία είναι δυνατόν να συσχετιστούν οι διάφοροι τύποι του μικροβίου που απομονώνονται από τα νοσοκομεία και να εντοπιστεί η πηγή μόλυνσας. Μια πλέον αξιόπιστη μοριακή μέθοδος που εφαρμόζεται τελευταία είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) η οποία αποσκοπεί στην αποτύπωση του γενετικού υλικού και συγκεκριμένα του χρωμοσωματικού DNA της *P. aeruginosa*.<sup>7</sup>

## Ευαισθησία στα αντιβιοτικά-Θεραπεία

Σε όλες τις περιπτώσεις η θεραπεία πρέπει να βασίζεται στο αντιβιογράμμα γιατί τα μικρόβια αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή σε μια πληθώρα αντιβιοτικών.

Στα κλασσικά αντιψευδομοναδικά αντιμικροβιακά φάρμακα ανήκουν η τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ, η πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, η κεφταζιντίμη, η κεφεπίμη, οι αμινογλυκοσίδες, η σιπροφλοξασίνη, η αζτρεονάμη και οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη και μεροπενέμη, όπως και η κολιμικίνη.<sup>5</sup>

Θεραπεία, με συνδυασμό ενός αντιβιοτικού της ομάδας των β-λακταμικών όπως τικαρκιλλίνη, κεφταζιδίμη κ.α. και ενός αντιβιοτικού της ομάδας των αμινογλυκοσιδών όπως αμικασίνη, νετιμικίμη κ.α. έχει δώσει θετικά αποτελέσματα. Μονοθεραπεία με ευρέως φάσματος β-λακταμικά (ιμιπενέμη) αντιβιοτικά έχει επιτυχία.<sup>7</sup>

## Πρόληψη

Η πρόληψη είναι ευκολότερη από τη θεραπεία και δεδομένου ότι το κυριότερο πρόβλημα που δημιουργεί ο μικροοργανισμός είναι οι νοσοκομειακές λοιμώξεις, τα μέτρα πρόφύλαξης κατευθύνονται προς αυτόν τον τομέα.

Σημειώνεται ότι ασθενείς με υψηλό ποσοστό κινδύνου, όπως άτομα που έχουν υποστεί μεταμόσχευση, εγκαυμάτιες κ.α. πρέπει να βρίσκονται σε αυστηρή απομόνωση. Επίσης, αντιμικροβιακά, αντισηπτικά και άλλες θεραπευτικές ουσίες και διαλύματα όπως αλοιφές, κρέμες, κολλύρια πρέπει να είναι ελεγμένα για τη στείρωσή τους. Σε νοσοκομειακές μονάδες επιβάλλεται λοιμώξεις που οφείλονται σε ένα στέλεχος να αντιμετωπίζονται ως σποραδικά κρούσματα. Παράλληλα όμως πρέπει να προσδιορίζονται τα επιδημικά στελέχη με κατάλληλες και σύγχρονες μεθόδους για τον έλεγχο και τον περιορισμό των νοσοκομειακών λοιμώξεων.<sup>7</sup>

## 2. Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά

### 2.1 Αντιβιοτικά

Αντιβιοτικά είναι ουσίες που καταστρέφουν το μικρόβιο χωρίς να βλάπτουν τον ξενιστή, τον άνθρωπο. Τα αντιβιοτικά είναι είτε φυσικές ουσίες, παράγονται δηλαδή στη φύση συνήθως από μικροοργανισμούς ή είναι συνθετικές ουσίες, που έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριο. Για να θεωρηθεί ένα αντιβιοτικό κλινικά δραστικό και συνεπώς χρήσιμο στην ιατρική, θα πρέπει η καταστροφή ή καλύτερα η αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού να επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού αντίστοιχες με τις συγκεντρώσεις που πετυχαίνουμε στον ανθρώπινο οργανισμό.

Υπάρχουν πολλές ομάδες αντιβιοτικών. Κάθε ομάδα αντιβιοτικών δρά με συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο στόχο μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Επίσης κάθε ομάδα αντιβιοτικών ή καλύτερα κάθε αντιβιοτικό διαθέτει συγκεκριμένη φαρμακοκινητική, που περιγράφει τα τμήματα του ανθρώπινου σώματος στα οποία εισέρχεται και τις συγκεντρώσεις που πετυχαίνει σε αυτά. Επίσης κάθε ομάδα αντιβιοτικών ή καλύτερα κάθε αντιβιοτικό έχει συγκεκριμένο φάσμα, δηλαδή καταστρέφει συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών.<sup>77</sup>

#### 2.1.1 Γενικές ιδιότητες αντιβιοτικών

**(1) Εκλεκτική τοξικότητα.** Βασική ιδιότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων είναι η εκλεκτική δράση τους επί των μικροβίων, χωρίς να παραβλάπτουν την λειτουργία των κυττάρων του φορέα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο βιολογικός στόχος δράσης των αντιβιοτικών λείπει από το κύτταρο του ξενιστή/φορέα. Από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται, μόνο τα β-λακταμικά παρουσιάζουν σαφή εκλεκτική τοξικότητα, ενώ άλλα εμφανίζουν επαρκή εκλεκτικότητα για την καταπολέμηση των λοιμώξεων.<sup>78</sup>

**(2) Φάσμα δράσης.** Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη ή καταστρέφουν διάφορα παθογόνα μικρόβια, κυρίως βακτήρια και λιγότερο ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Διακρίνονται σε:

**(i) ευρέος φάσματος,** είναι τα αντιβιοτικά που δρουν και σε Gram-θετικά και σε Gram-αρνητικά βακτήρια. Τέτοια είναι οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, οι κεφαλοσπορίνες, οι ημισυνθετικές πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι σουλφοναμίδες και οι αμινογλυκοσίδες, και σε

**(ii) στενού φάσματος,** είναι τα αντιβιοτικά που δρουν σε περιορισμένο είδος μικροβίων. Παράδειγμα η πενικιλίνη και η λινκομυκίνη που δρουν μόνο σε Gram-θετικά και η αζτρεονάμη με την πολυμιξίνη που δρουν μόνο σε Gram-αρνητικά βακτήρια.<sup>79</sup>

**(3) Τρόπος δράσης.** Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να προκαλέσουν το θάνατο των μικροβίων ή απλώς να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό τους. Με βάση αυτή τους την ιδιότητα, διακρίνονται σε :

**(i) βακτηριοκτόνα.** Λέγονται τα αντιβιοτικά που προκαλούν γρήγορα το θάνατο των βακτηρίων. Στα βακτηριοκτόνα υπάγονται οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες κ.α.

**(ii) βακτηριοστατικά.** Τα αντιβιοτικά αυτά προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων. Στα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά υπάγονται οι σουλφοναμίδες, οι τετρακυκλίνες κ.α.<sup>79</sup>

### 2.1.2 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών

Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών είναι τέσσερις και περιλαμβάνουν την αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, της πρωτεϊνοσύνθεσης, της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων και κυτταρικής μεμβράνης (εικ. 2)<sup>77</sup>.

#### ➤ Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης

Με το μηχανισμό αυτό δρουν οι αμινογλυκοσίδες, οι μακρολίδες, οι λινκοζαμίδες, η τετρακυκλίνη, η σπεκτινομυκίνη και η χλωραμφαινικόλη. Δρουν στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση διαταράσσοντας κυρίως τη ριβοσωματική λειτουργία.

#### ➤ Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι κινολόνες, οι σουλφοναμίδες, η νοβοβοικίνη, η τριμεθοπρίμη και η ριφαμπικίνη.

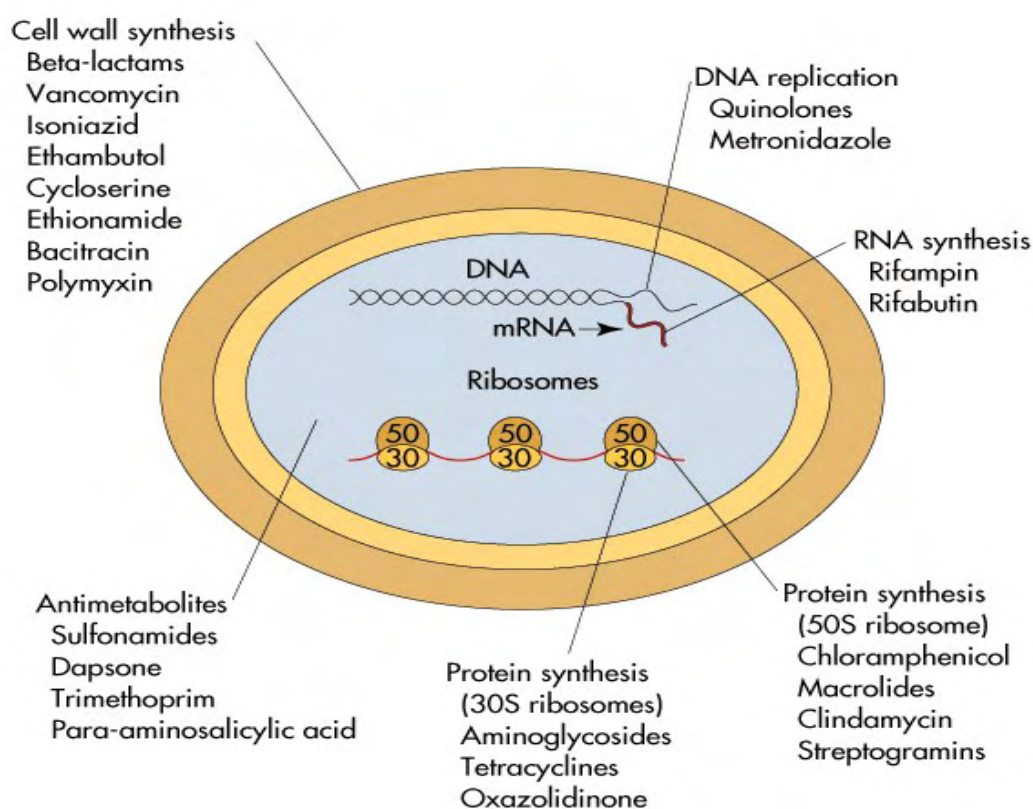
#### ➤ Διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης-αλλαγή στη διαπερατότητά της

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι πολυμυξίνες (B και E). Η διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου, καθώς η κυτταρική μεμβράνη ελέγχει τη διαβίβαση διαφόρων μορίων από και προς το κυτταρόπλασμα μέσω της παθητικής διάχυσης και της ενεργού μεταφοράς.<sup>80</sup>

#### ➤ Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος

Ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς δράσης των αντιβιοτικών αποτελεί η αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Σε αντίθεση με τα κύτταρα του μακροοργανισμού, τα μικρόβια περιβάλλονται από τοίχωμα που τα προστατεύει από τις μεταβολές της οσμωτικής πίεσης και άλλες μηχανικές επιδράσεις του περιβάλλοντος. Η χημική σύσταση του μικροβιακού τοιχώματος των κατά Gram αρνητικών αποτελείται στο 4-5% από το μουκοπεπτίδιο πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη).<sup>81</sup>

Το μηχανισμό δράσης μέσω αναστολής της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος ακολουθούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα γλυκοπεπτίδια και η φωσφομυκίνη.



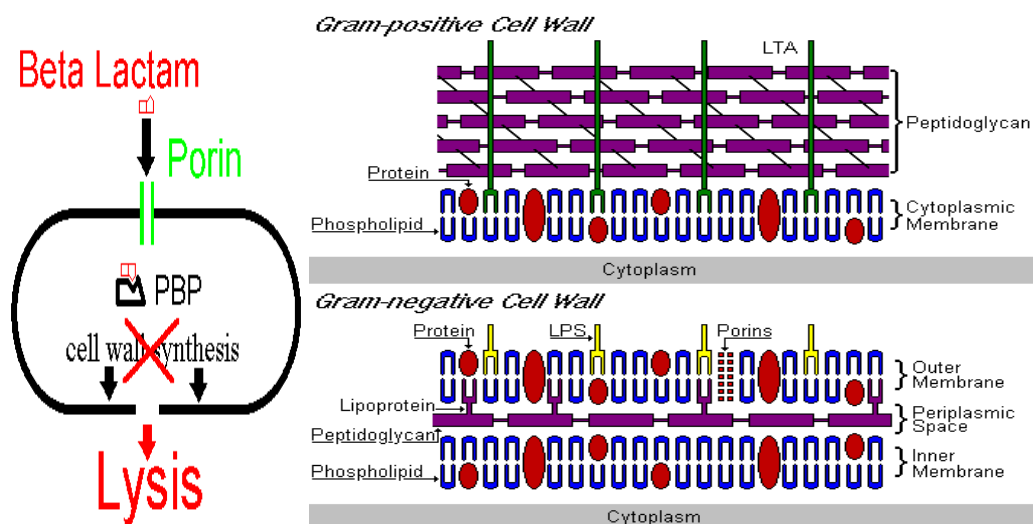
**Εικόνα 2 :** Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών.

## 2.2 β- λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι μεγάλη ομάδα αντιβιοτικών, χαρακτηριστικό των οποίων είναι ο δακτύλιος της β-λακτάμης τον οποίο περιέχουν.

Η ικανότητα των αντιβιοτικών αυτών να δεσμεύονται από ειδικές πρωτεΐνες της μεμβράνης των μικροβιακών κυττάρων τα καθιστά ικανά να συνδυάζουν μεγάλη αντιμικροβιακή δράση με πολύ χαμηλή τοξικότητα. Αναλυτικότερα, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων, συνδεόμενες με ένζυμα τα οποία είναι γνωστά ως πενικιλιοδεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins-PBPs). Κατά τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος οι πρωτεΐνες αυτές, που είναι καρβοξυλοπεπτιδάσες και τρανσπεπτιδάσες, είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση των τελευταίων σταδίων του κυτταρικού τοιχώματος του μικροβίου. Πιο συγκεκριμένα, οι πενικιλιοδεσμευτικές πρωτεΐνες είναι τα ένζυμα που καταλύουν το τελικό στάδιο τρανσπεπτιδίωσης της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού τοιχώματος (τρανσπεπτιδάσες). Οι β-λακτάμες συνδέονται ομοιοπολικά με τις PBPs παρεμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία τους και αναστέλλοντας τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης (εικ. 3).<sup>82</sup>

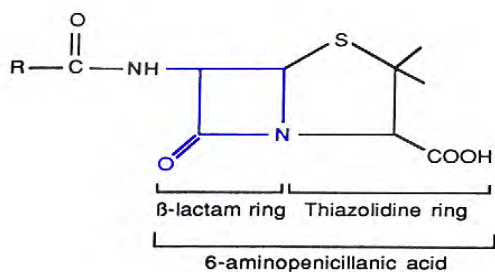
Συμπερασματικά, οι β-λακτάμες δε μπορούν να καταστρέψουν το υπάρχον κυτταρικό τοίχωμα, αναστέλλουν όμως το σχηματισμό νέου, κάτι το οποίο οδηγεί στο θάνατο του βακτηριακού κυττάρου.



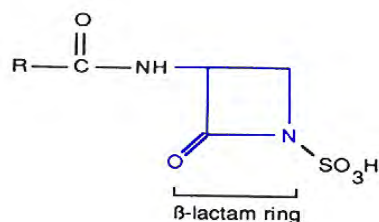
Εικόνα 3 : Μηχανισμός δράσης β-λακταμικών αντιβιοτικών.

Στη μεγάλη ομάδα των β-λακταμών περιλαμβάνονται οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοβακτάμες, οι καρβαπενέμες και οι αναστολείς των β-λακταμασών (εικ. 4).

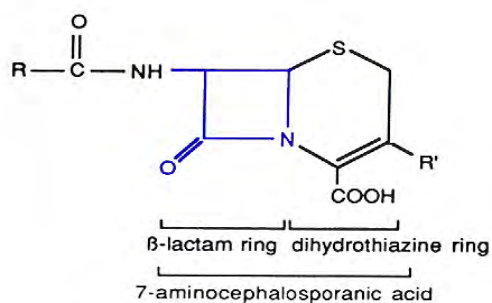
a) Penicillins



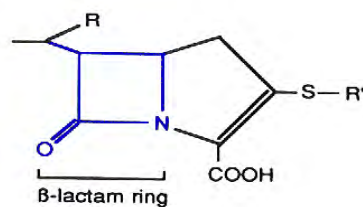
c) Monobactams



b) Cephalosporins



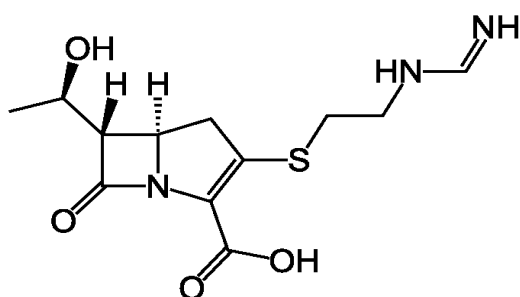
d) Carbapenems



**Εικόνα 4 :** β-λακτάμες.

Μικρή αναφορά θα γίνει μόνον στις καρβαπενέμες από την ομάδα των β-λακταμικών αντιβιοτικών.

### 2.2.1 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ



**Εικόνα 5 :** Ιμιπενέμη.



Οι καρβαπενέμες έχουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα και υπερτερούν έναντι των υπολοίπων β-λακταμών. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι όμοιος με τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες.<sup>83</sup>

Προέρχονται από το είδος *Streptomyces cattleya* και περιλαμβάνουν τα ολιβανικά οξέα. Η θειεναμυκίνη είναι το πρώτο μέλος από τις καρβαπενέμες. Παράγωγό της είναι η ιμιπενέμη (εικ. 5), που είναι 5-10 φορές πιο σταθερή απ' αυτή. Η ιμιπενέμη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με σιλαστατίνη, μία ουσία που αναστέλλει τη διάσπαση της ιμιπενέμης από τις νεφρικές διπεπτιδάσες.<sup>84</sup>

Όπως και τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, αναστέλλουν τη σύνθεση του βλεννοπεπτιδίου του κυτταρικού τοιχώματος. Αξιοσημείωτο είναι ότι δρουν έναντι της ψευδομονάδος της πτυοκυανικής σε συνδυασμό με μία αμινογλυκοσίδη.<sup>82</sup> Χορηγούνται παρεντερικώς. Συνιστάται για τη θεραπεία λοιμώξεων από μικρόβια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά.

### **2.3 Ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά**

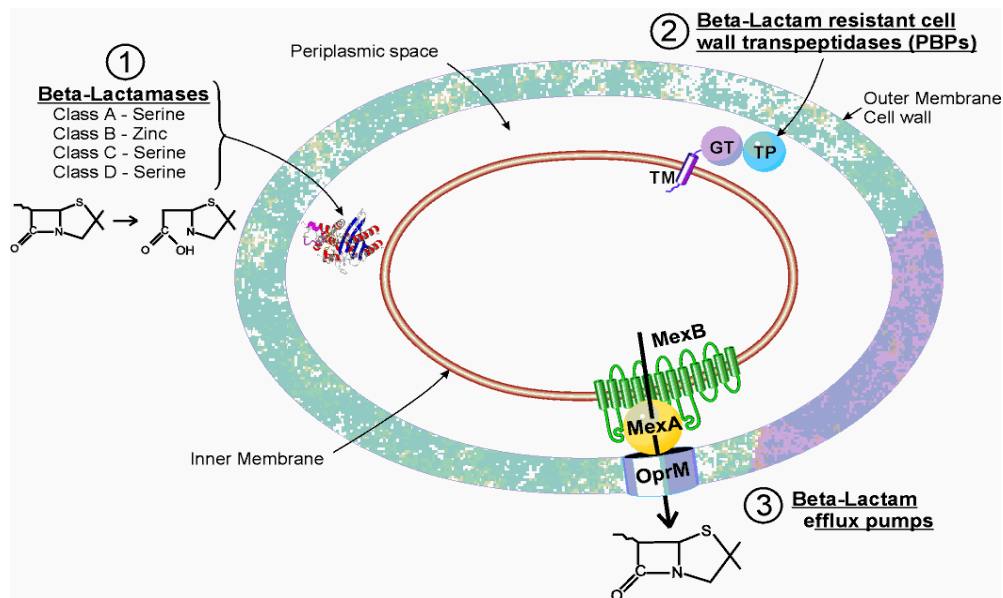
Μικρόβια ευαίσθητα έναντι ενός αντιβιοτικού είναι δυνατόν, μέσω αλλαγών που θα συμβούν σε αυτό, να καταστούν ανθεκτικά στη δράση του, δηλ. το αντιβιοτικό να μην παρεμποδίζει την ανάπτυξη του μικροβίου.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα μικρόβια έναντι αντιμικροβιακών ουσιών είναι γνωστή από πολλά έτη. Το πρόβλημα έγινε οξύτερο από την εμφάνιση και χρησιμοποίηση των σύγχρονων χημειοθεραπευτικών και αντιβιοτικών. Η μικροβιακή αυτή αντοχή προκύπτει από την αλόγιστη και άσκοπη χρήση αντιβιοτικών, τις μετακινήσεις πληθυσμών και την έλλειψη νέων φαρμάκων. Η αυξανόμενη εμφάνιση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας και υγειονομικής περίθαλψης στα νοσοκομεία, καθώς οι επιλογές των κλινικών ιατρών για αντιμετώπιση και θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων μειώνονται, ενώ επιμηκύνεται ο χρόνος και αυξάνεται το κόστος νοσηλείας καθώς και ο κίνδυνος επιπλοκών και θανάτου των ασθενών.<sup>85</sup>

Η ανθεκτικότητα των μικροβίων έναντι των αντιβιοτικών οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς (εικ. 6):

1. Αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης (αλλαγή διαμόρφωσης των σημείων δράσης των αντιβιοτικών).
2. Αδρανοποίηση των αντιβιοτικών με παραγωγή υδρολυτικών ή τροποποιητικών ενζύμων – π.χ. παραγωγή β-λακταμασών.
3. Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα (ελαττωμένη διαπερατότητα του βακτηριακού τοιχώματος – απώλεια πορινών).

4. Αντοχή από ενεργητική απέκκριση του αντιβιοτικού (μέσω αντλιών ενεργητικής αποβολής – efflux pumps).



Εικόνα 6 : Βιοχημικοί μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά.

Επιπλέον, η βακτηριακή αντοχή χωρίζεται σε **φυσική** και **επίκτητη**.

✚ **Φυσική αντοχή** καλείται η ιδιότητα ενός βακτηρίου να είναι εκ φύσεως ανθεκτικό σε ένα αντιβιοτικό γεγονός που μπορεί να προκύπτει από την έλλειψη συστήματος μεταφοράς και πρόσληψης του αντιβιοτικού ή μεταφοράς του στον στόχο που προσβάλλει το συγκεκριμένο αντιβιοτικό μέσα στο βακτηριακό κύτταρο. Για παράδειγμα, τα εντεροβακτηριοειδή έχουν φυσική αντοχή στην πενικιλίνη G, τα γλυκοπεπτιδία, τις μακρολίδες, τις στρεπτογραμμίνες και το φουσιδικό οξύ, ενώ η *P. aeruginosa* στην πενικιλίνη G, τις αμινοπενικιλίνες συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που συνδυάζονται με αναστολείς των β-λακταμασών.

✚ Η **επίκτητη αντοχή** αναφέρεται στην ικανότητα των βακτηρίων να προσαρμόζονται στην παρουσία αντιβιοτικών αναπτύσσοντας μηχανισμούς αντοχής, είτε μέσω:

- I. μεταλλάξεων (mutations) στο χρωμόσωμά τους, είτε με
  - II. απόκτηση γενετικού υλικού άλλων βακτηρίων (οριζόντια μεταφορά).
- Συχνά, ως αυτή καθαυτή επίκτητη αντοχή αναφέρεται μόνον αυτή που

οφείλεται σε οριζόντια μεταφορά και ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ στελεχών του ίδιου ή και διαφορετικών βακτηριακών ειδών.<sup>86</sup>

### 2.3.1 Ανθεκτικότητα από χρωματοσωματικές μεταβολές

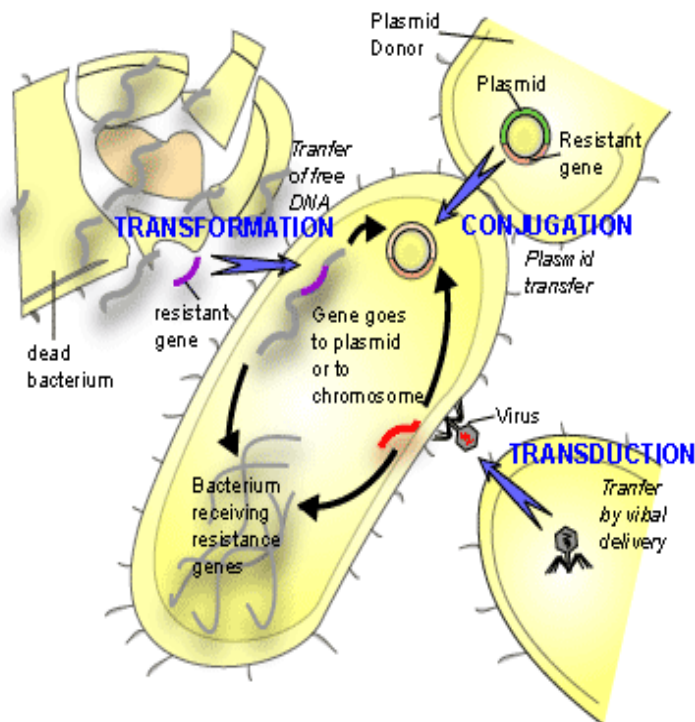
Κατά τη μορφή αυτής της ανθεκτικότητας εμφανίζονται στον μικροβιακό πληθυσμό αυτόματες μεταλλάξεις. Η εμφάνιση αυτών των μεταλλακτικών στοιχείων συμβαίνει χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού. Πρόκειται για μεταβολές σε γονίδια του μικροβιακού χρωματοσώματος. Η εμφάνιση αυτομάτως ανθεκτικών μεταλλακτικών στοιχείων σε έναν μικροβιακό πληθυσμό ποικίλλει ανάλογα με το αντιβιοτικό. Η εμφάνιση μεταλλάξεων είναι δυνατόν να αυξηθεί κατόπιν ακτινοβολιών ή επιδράσεως διαφόρων χημικών ουσιών. Εάν ο μικροβιακός πληθυσμός στον οποίο αυτόματα με μεταλλάξεις έχουν εμφανισθεί ανθεκτικά μικρόβια, καλλιεργηθεί παρουσία αντιβιοτικού, τα ευαίσθητα στοιχεία του πληθυσμού εξαφανίζονται και παραμένουν τα ανθεκτικά. Έτσι, ολόκληρος ο πληθυσμός εμφανίζεται ανθεκτικός. Ο βαθμός και η ταχύτητα εμφάνισης της από μετάλλαξη ανθεκτικότητας μικροβιακών στελεχών κατά την καλλιέργεια επί θρεπτικού υλικού που περιέχει αντιβιοτικό ποικίλλει ανάλογα με το αντιβιοτικό.<sup>82</sup>

Η ανθεκτικότητα που εμφανίζεται με τις μεταλλάξεις μπορεί να μεταδοθεί σε άλλα μικρόβια με τους μηχανισμούς της **μεταγωγής** και της **σύζευξης**. Η συχνότητα των μεταλλαγών είναι σπάνια, της τάξεως περίπου του  $10^{-8} - 10^{-9}$ . Αυτό σημαίνει ότι 1 στα  $10^8 - 10^9$  κύτταρα ενός πληθυσμού βακτηρίων θα αποκτήσουν αντοχή μέσω αυτής της διαδικασίας. Μεταφορά ανθεκτικότητας με το μηχανισμό της **μεταμορφώσεως** είναι πιθανόν να συμβαίνει αυτόματα αλλά σε μικρή συχνότητα.<sup>82</sup>

### 2.3.2 Ανθεκτικότητα από εξωχρωματοσωματικές μεταβολές – μεταφορά ανθεκτικότητας με πλασμίδια

Τα γονίδια αντοχής βρίσκονται σε εξωχρωμοσωματικά γενετικά στοιχεία (π.χ. πλασμίδια) ή σε τμήματα εξωχρωμοσωματικών στοιχείων ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα. Η μεταβίβαση αυτών των γονιδίων στο βακτήριο γίνεται με τρεις φυσικές διαδικασίες (εικ. 7):

- I. τη βακτηριακή σύζευξη (bacterial conjugation),
- II. τη γενετική μεταμόρφωση (genetic transformation)
- III. τη μεταγωγή μέσω βακτηριοφάγων (genetic transduction) και
- IV. τα μεταθετά γενετικά στοιχεία-τρανσποζόνια<sup>87</sup>



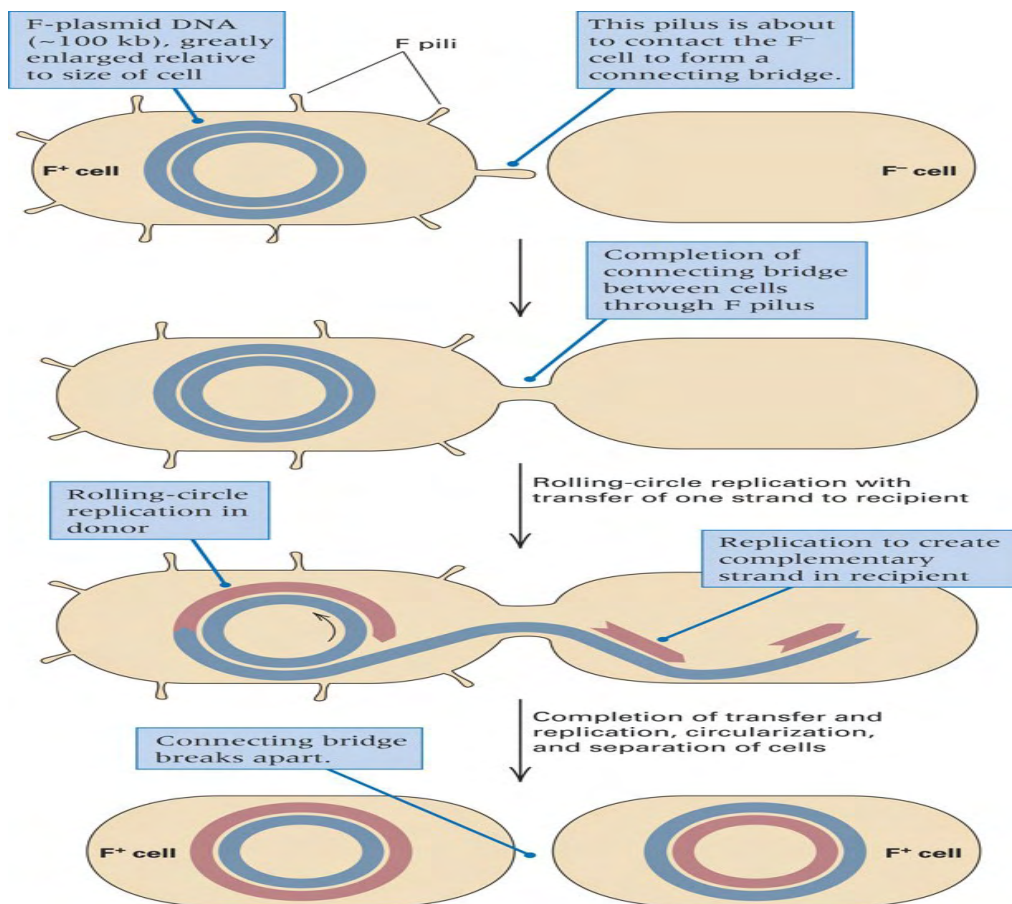
**Εικόνα 7 :** Ανθεκτικότητα από εξωχρωματοσωματικές μεταβολές.

## I. Βακτηριακή Σύζευξη

Με τον όρο σύζευξη εννοούμε τη φυσική επάφή μεταξύ δύο γενετικώς διαφόρων κυττάρων του ίδιου ή συγγενικού είδους και τη «δημιουργία συζευκτικού» σωλήνα μεταξύ αυτών (εικ. 8). Την κατ'αυτό τον τρόπο ένωση ακολουθεί η δίοδος γενετικού υλικού από το μικρόβιο δότη στο μικρόβιο δέκτη χωρίς να γίνεται ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ αυτών. Η διεργασία της σύζευξης είναι μεταβλητός και ασταθής τρόπος μεταφοράς γονιδίων. Παρατηρείται κυρίως στα Gram αρνητικά βακτήρια.<sup>82</sup>

Η σύζευξη επιτυγχάνεται με την ύπαρξη εντός του μικροβίου ενός πλασμιδίου. Τα **πλασμίδια** είναι μικρά κυκλικά τμήματα DNA, τα οποία βρίσκονται εκτός του χρωματοσώματος του μικροβίου. Είναι ανεξάρτητες, αυτοπολλαπλασιαζόμενες μονάδες. Τα πλασμίδια μπορούν να υπάρχουν στο βακτηριακό κύτταρο είτε ελεύθερα, οπότε και αναδιπλασιάζονται αυτόνομα, είτε και ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα, οπότε ακολουθούν τον κύκλο αναδιπλασιασμού του χρωμοσώματος. Μερικά πλασμίδια έχουν σχετικά μεγάλο μέγεθος και φέρουν διάφορα γονίδια, ενώ άλλα είναι μικρότερα. Τα επί των πλασμιδίων γονίδια ρυθμίζουν διάφορες δραστηριότητες των ίδιων των πλασμιδίων, αλλά και του φέροντος μικροβίου. Στις δραστηριότητες αυτές περιλαμβάνεται η αναπαραγωγή του

πλασμιδίου, η ικανότητα σύζευξης και μεταφοράς DNA σε άλλο μικρόβιο.<sup>82</sup> Επιπλέον, φέρουν σημαντικά γονίδια παθογονικότητας, παραγωγής εξωτοξινών και αντοχής στα αντιβιοτικά. Τα πλασμίδια αντοχής διακρίνονται σε **συζευκτικά** ή αυτομεταφερόμενα (conjugative ή self-transmissible) και σε **μη-συζευκτικά** (non-conjugative)<sup>20</sup>. Τα συζευκτικά πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν τη σύζευξη του βακτηρίου στο οποίο φιλοξενούνται με άλλα βακτήρια-δέκτες και, κατά τη διαδικασία της σύζευξης να αυτομεταφέρονται, μεταφέροντας έτσι στους νέους τους ξενιστές τις ιδιότητες που φέρουν στο γονιδίωμά τους. Τα μη συζευκτικά ή αδρανή πλασμίδια, δεν μπορούν να προκαλέσουν βακτηριακή σύζευξη και δεν αυτομεταφέρονται, αλλά μπορούν και αυτά να μεταφερθούν, αν κινητοποιηθούν από κάποιο άλλο, συζευκτικό πλασμίδιο, που μπορεί να συνυπάρχει στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο.<sup>87</sup>



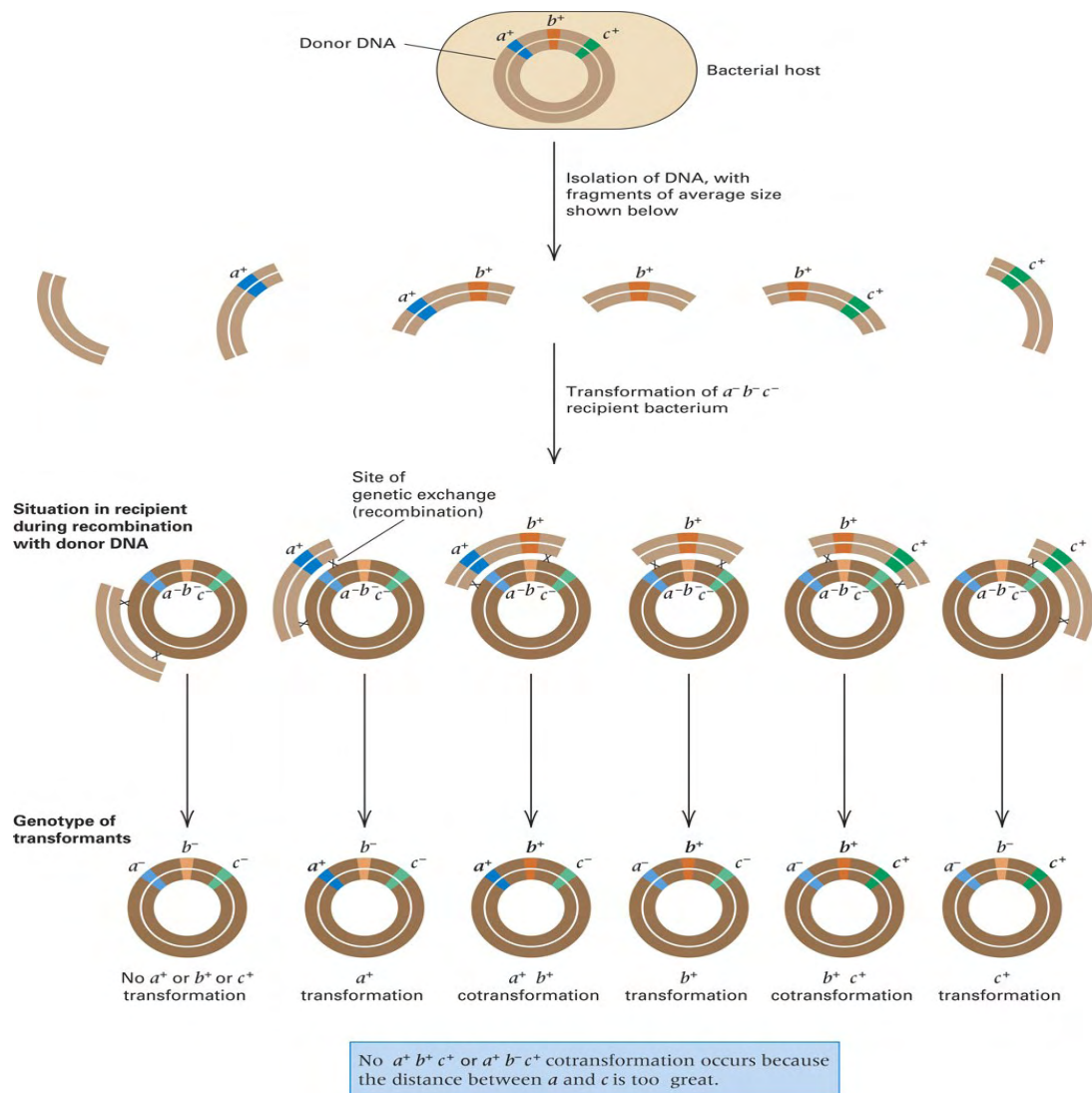
**Εικόνα 8 :** Διαδικασία βακτηριακής σύζευξης.

## II. Γενετική Μεταμόρφωση

Αφορά την ικανότητα του μικροοργανισμού να «προσροφά» γυμνό γενετικό υλικό από το περιβάλλον και να το ενσωματώνει στο δικό του γενετικό υλικό (εικ. 9). Τα γυμνά αυτά γενετικά υλικά συνήθως προέρχεται από νεκρά και λυμένα μικροβιακά κύτταρα. Ένα βακτήριο είναι ικανό να ενσωματώνει ξένο γυμνό DNA με την προϋπόθεση ότι εκφράζει όλα τα κατάλληλα ένζυμα.

Οι πνευμονιόκοκκοι αποτελούν παράδειγμα μικροβιακού είδους με μεγάλη ικανότητα μεταμόρφωσης.

Το εξωγενές DNA προσδένεται σε έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου-δέκτη και έπειτα εισέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στη συνέχεια μια εξωνουκλεάση αποικοδομεί τη μια αλυσίδα του DNA ώστε να καταστεί δίκλωνο και το εξωγενές DNA ενσωματώνεται σχηματίζοντας με ανασυνδυασμό μωσαϊκά γονίδια.<sup>86</sup>



Εικόνα 9 : Διαδικασία γενετικής μεταμόρφωσης.

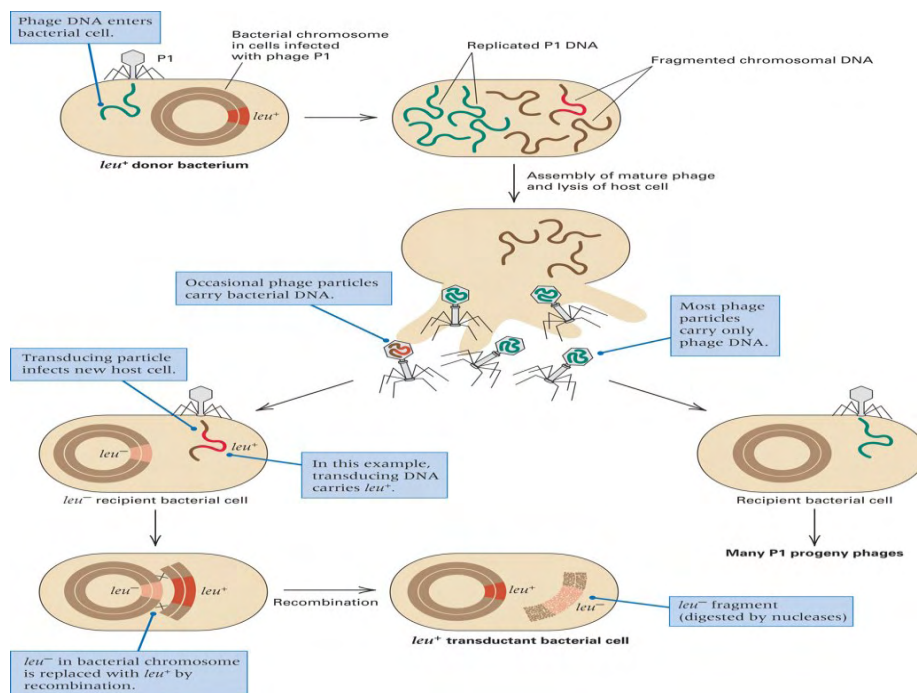


### III. Μεταγωγή από βακτηριοφάγους

Ονομάζεται η μεταφορά γενετικού υλικού ανάμεσα σε δύο βακτήρια μέσω βακτηριοφάγων (*transduction*). Οι φάγοι είναι ειδικοί ιοί βακτηριδίων, που παρασιτούν δηλαδή, μόνο σε βακτηριακά κύτταρα (εικ. 10). Η μεταφορά βακτηριακού γενετικού υλικού μπορεί να γίνει ως «παρενέργεια» του πολλαπλασιασμού του φάγου κατά:

- το λυτικό κύκλο πολλαπλασιασμού (**generalized transduction**), όπου κατά τον πολλαπλασιασμό του φάγου το βακτηριακό κύτταρο λύεται και τυχαία θραύσματα του γενετικού υλικού του θα εγκλειστούν σε θυγατρικά σωματίδια του φάγου, που στην συνέχεια θα μολύνουν άλλα βακτηριακά κύτταρα.

- το λυσιγόνο κύκλο αυτού (**specialized transduction**), όπου ο πολλαπλασιασμός του φάγου περιλαμβάνει μια φάση ενσωμάτωσης του DNA αυτού στο γενετικό υλικό του βακτηριδίου. Η σε δεύτερη φάση «αποκόλληση» του DNA του φάγου ενδεχομένως θα συμπαρασύρει και γειτονικό της περιοχής ενσωμάτωσης γενετικό υλικό του μικροοργανισμού, που στην συνέχεια επίσης θα μολύνουν άλλα βακτηριακά κύτταρα.



Εικόνα 10 : Διαδικασία βακτηριακής μεταγωγής.

#### IV. Μεταθετά γενετικά στοιχεία

Στα πλασμίδια αντοχής μπορούν να ενσωματωθούν είτε μεμονωμένα γονίδια αντοχής, είτε μεταθετά γενετικά στοιχεία, όπως τρανσποζόνια ή ιντεργκρόνια που μπορεί να φέρουν περισσότερα γονίδια αντοχής. Τα μεταθετά στοιχεία επιτρέπουν στα γονίδια να μετακινούνται μέσα στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου ή μεταξύ γονιδιωμάτων διαφορετικών βακτηρίων. Συμπερασματικά, συμμετέχουν στην οριζόντια μεταφορά αντοχής.<sup>88</sup>

**Τρανσποζόνια:** αποτελούν δομές πάνω στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού (χρωμόσωμα ή πλασμίδιο) που έχουν την ικανότητα μετακίνησης από μόριο DNA σε μόριο DNA. Τα απλούστερα τρανσποζόνια που καλούνται και αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequences-IS) κωδικογραφούν ένα ένζυμο την τρανσποσάση που καταλύει την μετακίνησή τους, ενώ φέρουν στα άκρα τους τις λεγόμενες ανάστροφες αλληλουχίες (inverted repeats) 20-100 βάσεων απαραίτητες για την μετακίνησή τους. Τα πλέον σύνθετα τρανσποζόνια αποτελούνται από δύο IS που περιβάλουν σειρά γονιδίων παθογένειας, αντοχής κλπ.

**Ιντεργκρόνια:** είναι γενετικά στοιχεία που μπορούν να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες. Με άλλα λόγια, 'παγιδεύουν' γονίδια αντοχής. Χαρακτηρίζονται από τρία δομικά στοιχεία, την ιντεργκράση, την ειδική θέση ανασυνδιασμού για την ενσωμάτωση της κασέτας και τον κοινό υποκινητή για την έκφραση ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών. Δεν κινούνται, αλλά μετακινούνται με πλασμίδια και τρανσποζόνια, ενώ έχουν βρεθεί και στο βακτηριακό χρωμόσωμα.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί πως **γονιδιακές κασέτες** ονομάζουμε μικρά μεταθετά στοιχεία τα οποία περιλαμβάνουν ένα γονίδιο και μια θέση ανασυνδιασμού.<sup>89</sup>

#### 2.4 Μηχανισμοί αντοχής εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas aeruginosa* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Ομάδα αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται συχνά στην κλινική πράξη για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων είναι τα β-λακταμικά, στα οποία όπως προαναφέρθηκε ανήκουν οι καρβαπενέμες. Στην παρούσα ανασκόπηση θα γίνει προσπάθεια ερμηνείας των φαινοτύπων αντοχής που αφορούν τις καρβαπενέμες για τα εντεροβακτηριοειδή και την *P. aeruginosa*.

Οι μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν: 1) την παραγωγή β-λακταμασών, 2) την απώλεια πορινών με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης, 3) τα συστήματα αντλιών αποβολής του αντιβιοτικού (efflux

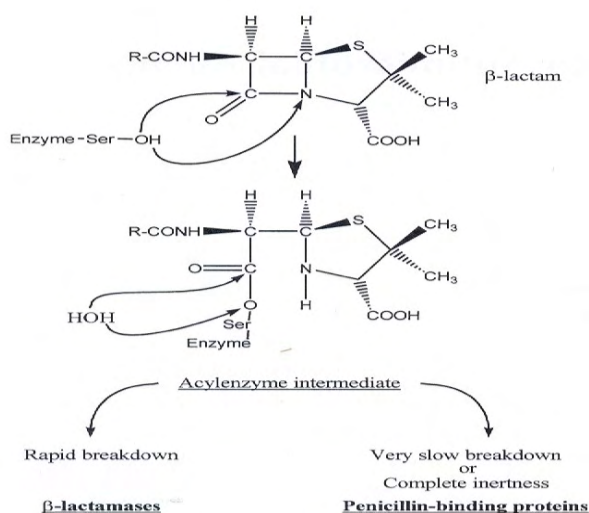


umps-αντλίες εκροής), καθώς και πιο σπάνια 4) τη τροποποίηση στόχου δράσης-PBPs. Η παραγωγή β-λακταμασών παραμένει ο πιο σημαντικός μηχανισμός αντοχής των Gram-αρνητικών βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.<sup>90</sup>

### 2.4.1 Παραγωγή β-λακταμασών

Οι διάφοροι μικροοργανισμοί παράγουν πολλά είδη ενζύμων που υδρολύουν τα αντιβιοτικά της β-λακτάμης. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται β-λακταμάσες. Πρόκειται για βακτηριακά ένζυμα πρωτεϊνικής φύσεως που εκκρίνονται στο περιβάλλον του μικροβιακού κυττάρου για τα Gram θετικά βακτήρια ή στον περιπλασματικό χώρο για τα Gram αρνητικά βακτήρια (μεταξύ εξωτερικής και κυτταροπλασματικής μεμβράνης) και κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια.<sup>90,91</sup>

Αδρανοποιούν τις β-λακτάμες υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό  $O = C - N$  του β-λακταμικού δακτυλίου (εικ. 11). Στις περισσότερες β-λακταμάσες η υδρόλυση επιτυγχάνεται με αντίδραση ακετυλίωσης μεταξύ του καρβονυλίου του β-λακταμικού δακτυλίου και του υδροξυλίου της σερίνης του ενεργού κέντρου. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εστέρα, ο οποίος στη συνέχεια υδρολύεται και το προϊόν της υδρόλυσης είναι το ανενεργό αντιβιοτικό. Οι περισσότερες β-λακταμάσες διασπούν το β-λακταμικό δακτύλιο με τον παραπάνω τρόπο. Υπάρχουν όμως και μερικές β-λακταμάσες που χρησιμοποιούν ιόντα ψευδαργύρου για τη διάσπαση του β-λακταμικού δακτυλίου, τα ονομαζόμενα μεταλλοένζυμα.<sup>92</sup>



Εικόνα 11 : Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών.

### 2.4.1.1 Κατάταξη β-λακταμασών

Για την ταξινόμηση των β-λακταμασών έχουν προταθεί ποικίλοι τρόποι, βάσει το υδρολυτικό τους φάσμα, την ευαισθησία τους στους αναστολείς ή την εντόπισή τους στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδιο. Πιο συγκεκριμένα οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε:

- χρωμοσωματικές ή πλασμιδικές
- ενδογενείς ή επίκτητες
- ιδιοσυστασιακές ή επαγωγίμες
- σερινοτρανσφεράσες (εστέρας σερίνης) ή μεταλλο-β-λακταμάσες (ιόν  $Zn^{2+}$ )

Δύο σχήματα κυρίως επικράτησαν στη ταξινόμηση των β-λακταμασών:

- I. Η λειτουργική ταξινόμηση (1995) κατά Bush-Jacoby-Medeiros
  - Σε ομάδες (groups) 1,2,3,4 και
  - Σε υποομάδες (subgroups) 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f
- II. Η μοριακή ταξινόμηση (1980) κατά κατά Ambler
  - Σε τάξεις (classes) A, B, C, D

Σύμφωνα με το σύστημα Ambler, οι β-λακταμάσες κατατάσσονται σε τέσσερις μοριακές τάξεις A, B, C και D βάσει την αμινοξικής τους αλληλουχίας και τη μοριακής τους δομής. Τα ένζυμα που έχουν σερίνη στο ενεργό κέντρο κατατάσσονται στις τάξεις A, C και D ενώ στην τάξη B κατατάσσονται τα μεταλλοένζυμα.

Πιο αναλυτικά η ταξινόμηση παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.<sup>93</sup>

<b>Bush et al</b>	<b>Ambler</b>	<b>Αναστολή Clav/EDTA</b>	<b>Βασικά χαρακτηριστικά</b>
1	C	-	Κεφαλοσπορινάσες- <b>AmpC</b>
2a	A	Clav	Πενικιλινάσες (Σταφυλοκοκ./Εντεροκοκ.)
2b	A	Clav	TEM-1,-2 & SHV-1
2be	A	Clav	<b>ESBL</b> (TEM- & SHV-)
2br	A	Clav μικρή	Inhibitor Resistant TEM (IRT)
2c	A	Clav	Καρμπενικιλινάσες PSE-
2e	A	Clav	Κεφουροξιμάσες
2f	A	Clav	<b>Καρμπαπενεμάσες - KPC</b>
2d	D	Clav ποικίλη	Οξακιλ/άσες – <b>ESBL-Καρβ/σες</b>

3	B	EDTA	<b>Μεταλλο-Καρβαπενεμάσες</b>
---	---	------	-------------------------------

**Πίνακας 1** : Ταξινόμηση β-λακταμασών.

## Τάξη A

Η τάξη A αντιπροσωπεύει τη μεγαλύτερη ομάδα β-λακταμασών. Εδώ ανήκουν οι παλαιότερες **πενικιλινάσες**, οι περισσότερες εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum B-Lactamases –**ESBLs**) και ορισμένες **καρβαπενεμάσες**.

Οι **πενικιλινάσες** έχουν ένα σχετικά περιορισμένο υδρολυτικό φάσμα και είναι οι επικρατέστερες β-λακταμάσες σε Gram θετικούς κόκκους. Εδώ κατατάσσονται οι β-λακταμάσες TEM-1, TEM-2 και SHV-1. Είναι κυρίως πλασμιδιακές, υδρολύουν κυρίως τις πενικιλίνες ευρέος φάσματος και κάποιες 1ης γενιάς κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλονται από τους αναστολείς β-λακταμασών κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη<sup>94,102</sup>.

Οι **εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs)** εμφανίζουν παγκόσμια διασπορά. Η πρώτη αναφορά για πλασμιδιακό ένζυμο ικανό να υδρολύει νεότερες κεφαλοσπορίνες δημοσιεύτηκε το 1983.<sup>89</sup> Οι περισσότερες από αυτές προέρχονται από τις αρχικές TEM-1, TEM-2 και SHV-1 και παρουσιάζονται συχνότερα σε *K. pneumoniae* και *Escherichia coli*. Κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε πλασμίδια, συχνά μαζί με άλλα γονίδια αντοχής με αποτέλεσμα την πολυαντοχή. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες, όμως δεν υδρολύουν τις καρβαπενέμες και αναστέλλονται από κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη.<sup>102</sup> Από την ταξινόμηση των β-λακταμασών το 1995 έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 9 TEM και 29 SHV ένζυμα.<sup>91</sup>

Στις εκτεταμένου φάσματος τάξης A ανήκουν οι νεότερες ESBLs τύπου CTX-M ένζυμα που σχετίζονται με τις χρωμοσωματικές β-λακταμάσες που έχουν προσδιοριστεί στα είδη *Kluyvera* και διαδόθηκαν δραματικά και στην Ελλάδα μετά το 1995. Ταξινομούνται σε 5 υποομάδες: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. Οπως υποδηλώνει και το όνομά τους, υδρολύουν την κεφοταξίμη πιο εύκολα απ'ότι την κεφαζιδίμη (με εξαίρεση των CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-27). Πολλά υδρολύουν εξίσου καλά την κεφεπίμη. Αναστέλλονται πολύ καλά από τη ταζομπακτάμη και μέτρια από το κλαβουλανικό οξύ.

Στην ομάδα αυτή ανήκουν και άλλες πιο σπάνιες β-λακταμάσες, όπως οι τύπου VEB (VEB-1 έως VEB -6), οι οποίες είναι χρωμοσωματικές ή πλασμιδιακές και άλλες, όπως οι BES-1, SFO-1, PER1-3, TLA1-2, και BEL-1. Η ανίχνευση τους γίνεται με μέτρηση ζωνών αναστολής και δοκιμές συνέργειας δίσκων.<sup>94</sup>

Στις **καρβαπενεμάσες τάξης A** περιλαμβάνονται οι χρωμοσωματικές SME-1 έως SME-3, IMI-1 και IMI -2 και NMC-A καθώς και τις πλασμιδιακές GES/IBC και KPC. Το γεγονός ότι οι καρβαπενέμες είναι θεραπεία εκλογής για σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούνται από εντεροβακτηριοειδή που παράγουν ESBLs, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη συχνότητα αντοχής των εντεροβακτηριοειδών στις φθοριοκινολόνες, έχει οδηγήσει σε έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την έγκαιρη ανίχνευση των καρβαπενεμασών στην κλινική πράξη.<sup>94</sup>

❖ Χρωμοσωματικά κωδικοποιούμενα ένζυμα.

Εμφανίστηκαν στις αρχές τις δεκαετίας του '80 πριν την κλινική χρήση της ιμιπενέμης. Η SME-1 β-λακταμάση ("*Serratia marcescens* enzyme") ανιχνεύτηκε πρώτα στην Αγγλία το 1982 σε 2 στελέχη *S. marcescens*.<sup>95</sup> Η SME-1, μαζί με τα σχεδόν ταυτόσημα SME-2 και SME-3, έχουν βρεθεί σποραδικά και στις ΗΠΑ καθώς και στην Ελβετία (2006).<sup>96</sup> Τα IMI (imipenem-hydrolyzing β-lactamase) και NMC-A (not metalloenzyme carbapenemase) έχουν ανιχνευθεί σε κλινικά στελέχη *E. cloacae*.<sup>97,98</sup>

Τα SME, NMC και IMI υδρολύουν πενικιλίνες, παλαιότερες κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και καρβαπενέμες. Υδρολύουν ανεπαρκώς την cefoxitin, τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και την κεφοταξίμη ταχύτερα από την κεφαζιδίμη, ενώ αναστέλλονται εν μέρει από τους αναστολλείς.

❖ Πλασμιδιακά κωδικοποιούμενα ένζυμα.

Έχουν 1000 φορές μικρότερη δραστηριότητα σε σχέση με τις χρωμοσωματικές. Η GES/IBC οικογένεια με αναφορά της IBC-1 (integron-borne cephalosporinase) περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα<sup>103</sup> σε στέλεχος *E. cloacae* και της GES-1 (Guiana extended spectrum) στην Γαλλική Γουιάνα σε στέλεχος *K. pneumoniae*.<sup>104</sup> Το όνομα IBC μετατράπηκε σε ονοματολογία GES. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 9 ποικιλίες GES (GES-1 έως GES-9), οι οποίες είναι πλασμιδιακές.

Η ομάδα των KPC καρβαπενεμασών (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) περιλαμβάνει 11 ενζυμικές ποικιλίες (KPC-1/2 έως KPC-12). Η καρβαπενεμάση KPC-1/2 εμφανίστηκε το 1996 στη Βόρεια Καρολίνα, σε στέλεχος *K. pneumoniae*. Ονομάστηκε έτσι, καθώς βρήκαν πως η KPC-1 και -2 έχουν ταυτόσημες αλληλουχίες. Αν και οι KPC ευρίσκονται κυριαρχικά στην *K. pneumoniae*,<sup>99,100</sup> έχουν βρεθεί στην *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. και στην *P. aeruginosa*.<sup>101</sup> Δύο χαρακτηριστικά ξεχωρίζουν τις KPC καρβαπενεμάσες από τα άλλα ένζυμα της λειτουργικής ομάδος τους: πρώτον, εντοπίζονται σε μεταφερόμενα πλασμίδια και δεύτερον, υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Έχουν ευρύ φάσμα υδρόλυσης, στο οποίο περιλαμβάνονται πενικιλίνες, νεότερες κεφαλοσπορίνες, όπως η κεφοταξίμη, η κεφαζιδίμη και η κεφεπίμη, καρβαπενέμες και μονοβακτάμες. Δεν υδρολύουν τις κεφαμυκίνες, ενώ αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ανιχνεύονται με δοκιμασία αναστολής από βορονικό οξύ.

Κωδικοποιούνται από το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>*, του οποίου η γεωγραφική εξάπλωση, αλλά και η διάδοση μεταξύ των ειδών, εξηγείται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση του σε ένα τρανσποζόνιο. Αυτό το τρανσποζόνιο είναι ένα γενετικό στοιχείο ικανό να εισάγεται σε διαφορετικά πλασμίδια Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα πλασμίδια αντοχής που φέρουν το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* συχνά συνδέονται με γενετικούς οριστές αντοχής για άλλα αντιβιοτικά.<sup>1</sup> Οι KPC β-λακταμάσες διαθέτουν μεγάλη ικανότητα διασποράς και εύκολα χαρακτηρίζονται σαν ESBL, ενώ η ανίχνευσή τους είναι δύσκολη, καθώς πολλές φορές τα επίπεδα αντοχής (MIC) στις καρβαπενέμες που προσδίδουν στα βακτήρια που τις παράγουν είναι χαμηλά.<sup>94</sup>

## Τάξη Β

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (**MBLs**), μπορούν να διαιρεθούν σε εκείνες που φυσιολογικά κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα και σε εκείνες που κωδικοποιούνται από μεταβιβάσιμα γονίδια.

Τα χρωμοσωμιακά ένζυμα ευρίσκονται σε ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια του περιβάλλοντος και με εξαίρεση την *S. Maltophilia*, δεν συνδέονται συχνά με σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις και δεν μεταφέρονται εύκολα.

Σε αντίθεση με τις χρωμοσωμιακές MBLs τα επίκτητα και μεταβιβάσιμα μεταλλοένζυμα παρουσιάζουν μια δραματική αύξηση στην ανίχνευση και στη γεωγραφική τους διασπορά. Περιλαμβάνουν τις οικογένειες VIM, IMP, GIM (German imipenemase), SPM (Sao Paulo metallo-β-lactamase) και SIM (Seoul imipenemase).

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες που αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα β-λακταμασών τόσο λειτουργικά όσο και δομικά, παράγονται συνήθως στα κλινικά στελέχη σε συνδυασμό με μια δεύτερη ή και τρίτη β-λακταμάση. Διαφέρουν δομικά από τις υπόλοιπες β-λακταμάσες, λόγω της παρουσίας ψευδαργύρου αντί για σερίνη στο ενεργό τους κέντρο. Λειτουργικά διακρίνονταν αρχικά κυρίως από την ικανότητά τους να υδρολύουν καρβαπενέμες, αλλά αργότερα διαπιστώθηκε ότι και μερικές β-λακταμάσες σερίνης έχουν αυτή την ικανότητα. Σε αντίθεση με τις β-λακταμάσες σερίνης, οι μεταλλο-β-λακταμάσες έχουν μικρή υδρολυτική ικανότητα για μονοβακτάμες και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζοβακτάμη. Αναστέλλονται όμως από χηλικές ενώσεις μεταλλικών ιόντων όπως EDTA και κωδικοποιούνται από γονίδια που φέρονται σε ιντεργκρόνια τάξης 1. Για την ανίχνευση τους χρησιμοποιείται ο αναστολέας EDTA σε συνδυασμό με καρβαπενέμη ή/και κεφταζιδίμη, γιατί η παραγωγή μεταλλοενζύμου δεν αυξάνει πάντα την αντοχή στις καρβαπενέμες τόσο, ώστε να θεωρηθεί ανθεκτικό το στέλεχος και έτσι οι μικροοργανισμοί που παράγουν μεταλλοένζυμα μπορεί να έχουν MIC μέσα στα όρια ευαισθησίας.<sup>105</sup>

IMP-τύπου μεταλλο-β-λακταμάσες. Το πρώτο IMP-1 ένζυμο ανιχνεύτηκε στην *P. aeruginosa* από Ιάπωνες,<sup>106</sup> ενώ το πρώτο IMP-τύπου ένζυμο που βρέθηκε στην Ευρώπη ήταν το IMP-2, το οποίο ανιχνεύτηκε σε στέλεχος του *A. baumannii* στην Ιταλία.<sup>107</sup>

VIM-τύπου μεταλλο-β-λακταμάσες. Μια άλλη οικογένεια μεταλλο-β-λακταμασών που επικρατεί αποτελείται από τα VIM ένζυμα (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase). Μέχρι στιγμής, η μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες, κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύεται από τα ένζυμα VIM-1, VIM-2 και VIM-7 αντίστοιχα. Η ομάδα VIM-1 αποτελείται από τις μεταλλο-β-λακταμάσες VIM-4, VIM-5 και VIM-11a. Έξι μεταλλο-β-λακταμάσες (VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10 και VIM11b) θεωρούνται παράγωγα της VIM-2, η οποία παρουσιάζει 90% γενετική ομοιότητα με την VIM-1. Τέλος, η VIM-7 διακρίνεται από τις υπόλοιπες μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM.<sup>108</sup> Το VIM-1 ένζυμο απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Βερόνα της Ιταλίας,<sup>109</sup> ενώ αμέσως μετά ανιχνεύτηκε το VIM-2 στη Γαλλία.<sup>110</sup> Και τα δύο ένζυμα ανιχνεύτηκαν σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*. Στην χώρα μας έχουν απομονωθεί VIM-1 σε Εντεροβακτηριακά (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*)<sup>111</sup>, σε *A. baumannii*<sup>112</sup> και VIM-1, VIM-2 και VIM-4MBLs στην *P. aeruginosa*.<sup>113,114</sup>

Πρόσφατα περιγράφηκε η NDM-1 μεταλλο-β-λακταμάση (New Delhi metallo-beta-lactamase),<sup>115</sup> η οποία υδρολύει όλα τα β-λακταμικά πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες με εξαίρεση την αζτρεονάμη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM-1 βρέθηκε σε πλασμίδιο σε ένα μεταβιβάσιμο γενετικό στοιχείο μεγέθους 180-kb που περιέχει μια ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων όπως: (α) γονίδιο που κωδικοποιεί την CMY-4 (AmpC β-λακταμάση), (β) γονίδια που αδρανοποιούν ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, ριφαμπικίνη, και χλωραμφαινικόλη και (γ) γονίδιο που κωδικοποιεί αντλίες εκροής, κάτι που προκαλεί επιπρόσθετη αντιμικροβιακή αντοχή.<sup>116</sup> Στελέχη με NDM-1 σχεδόν πάντα έχουν μια 16S rRNA μεθυλάση, η οποία προσφέρει αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες. Η NDM-1 έχει ανιχνευθεί κυρίως σε *K. pneumoniae* αλλά και σε *E. coli* και *E. cloacae*. Τα στελέχη που παράγουν NDM-1 είναι πολυανθεκτικά με ευαισθησία μόνο στις πολυμυξίνες και τιγκεκυκλίνη.

## Τάξη C

Η τάξη C συμπεριλαμβάνει τις **AmpC β-λακταμάσες** ή αλλιώς κεφαλοσπορινάσες. Κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα των περισσότερων ειδών *Enterobacteriaceae* και λίγων άλλων οργανισμών. Εκτός από τις χρωμοσωματικές AmpC, στα εντεροβακτηριοειδή απαντούν και πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες τάξης C, οι οποίες έχουν προέλθει με απόσπαση των αντιστοίχων γονιδίων από τα χρωμοσώματα διαφόρων ειδών και την

ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια, μαζί ή, συνηθέστερα, χωρίς το σύστημα γονιδίων που ρυθμίζει την έκφρασή τους στην αρχική τους χρωμοσωματική εντόπιση. Πλασμιδιακές κεφαλοσπορινάσες που έχουν καταγραφεί ως σήμερα είναι οι διάφοροι τύποι των οικογενειών CMY, FOX, MOX, DHA και ACC.<sup>117</sup>

Τόσο οι χρωμοσωμιακές όσο και οι πλασμιδιακά κωδικοποιούμενες AmpC β-λακταμάσες προσφέρουν ευρύτερο φάσμα αντοχής από τις ESBLs, διότι υδρολύουν πενικιλίνες, οξυαμινοκεφαλοσπορίνες (ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone), κεφαμυκίνες (cefoxitin και cefotetan), και μονομπακτάμες (aztreonam). Οι AmpC β-λακταμάσες δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών (clavulanic acid, sulbactam, tazobactam) και δεν υδρολύουν ceferime, ceftriome, και καρβαπενέμες.

Υπερπαραγωγή των AmpCs συνδέεται συχνά με απώλεια ή αλλαγή μια πορίνης στην εξωτερική μεμβράνη, η οποία οδηγεί σε υψηλού επιπέδου αντοχή όχι μόνο σε όλες τις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και μονομπακτάμες, αλλά επίσης και στις καρβαπενέμες, λόγω ελαττωμένης διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και συνεπώς ελαττωμένης πρόσληψης του αντιβιοτικού.<sup>117</sup> Συγκεκριμένα, η *P. aeruginosa* φέρει μια χρωμοσωμιακά κωδικοποιούμενη AmpC επαγωγίμη β-λακταμάση. Τα φυσικά στελέχη παράγουν μικρά ποσά AmpC και παραμένουν ευαίσθητα στις αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες, συνδυασμούς πενικιλινών με αναστολείς των β-λακταμασών, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες. Υπερπαραγωγή της AmpC προσφέρει αντοχή της *P. Aeruginosa* σε όλα τα β-λακταμικά με εξαίρεση τις καρβαπενέμες, ενώ εντεροβακτηριακά με υπερπαραγωγή AmpC παραμένουν ευαίσθητα εκτός από τις καρβαπενέμες και στην ceferime. Η υπερπαραγωγή της χρωμοσωμιακής AmpC μπορεί να προκληθεί: (α) με επαγωγή, η οποία απαιτεί σύνδεση ενός επαγωγίμου β-λακταμικού παράγοντα ή ενός αναστολέα β-λακταμάσης (π.χ cefoxitine, imipenem, clavulanate) με τις PBPs (η διαδικασία είναι αναστρέψιμη μετά την απομάκρυνση του επαγωγέα) και (β) με χρωμοσωμιακή μετάλλαξη των γονιδίων που ρυθμίζουν την έκφραση της AmpC, η οποία οδηγεί σε υψηλού επιπέδου παραγωγή (derepression) της κεφαλοσπορινάσης χωρίς την παρουσία κάποιου επαγωγέα.<sup>118</sup> Επειδή το κλαβουλανικό οξύ προκαλεί την έκφραση της AmpC β-λακταμάσης και ανταγωνίζεται έτσι την βακτηριοκτόνο δράση της ticarcillin, έχει προταθεί η αποφυγή του συνδυασμού ticarcillin-clavulanate στην επιλογή των αντιψευδομοναδικών β-λακταμικών αντιβιοτικών.<sup>119</sup>

## Τάξη D

Σε αυτή την τάξη ανήκουν οι OXA-β-λακταμάσες ή αλλιώς οξακιλλινάσες και οι OXA-τύπου καρβαπενεμάσες.

Οι **ΟΧΑ-β-λακταμάσες** είναι ασυνήθεις και χαρακτηρίζονται από ετερογένεια ως προς τη δομή και τις βιοχημικές ιδιότητες. Ονομάζονται έτσι διότι υδρολύουν την oxacillin και cloxacillin. Υπάρχουν 102 εκ των οποίων περίπου 10 είναι ESBLs και 37 έχουν δράση καρβαπενεμάσης. Οι περισσότερες ΟΧΑ-τύπου β-λακταμάσες δεν υδρολύουν τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και δεν είναι ESBLs. Γενικώς τα ΟΧΑ-τύπου ένζυμα είναι ανθεκτικά στην αναστολή από clavulanate, sulbactam και tazobactam με μερικές εξαιρέσεις (π.χ η ΟΧΑ-2 και ΟΧΑ-32 αναστέλλονται από το tazobactam αλλά όχι από το clavulanate και sulbactam και η ΟΧΑ-53 αναστέλλεται από το clavulanate). Ανιχνεύονται κυρίως στην *P. aeruginosa* αλλά και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια. Οι ΟΧΑ-τύπου ESBL περιλαμβάνουν την ΟΧΑ-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35 και -45. Τα ένζυμα αυτά προκαλούν ανοχή συνήθως στην cefotaxime και σπανιότερα στην ceftazidime και aztreonam.<sup>120</sup>

Οι **ΟΧΑ-τύπου καρβαπενεμάσες** βρίσκονται κυρίως στο *Acinetobacter spp.* Αποτελούν τον βασικότερο μηχανισμό ανοχής του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες. Υπάρχουν 9 μείζονες υποομάδες ΟΧΑ-τύπου καρβαπενεμασών. Η ARI-1 (*Acinetobacter* resistant to imipenem) ήταν η πρώτη καρβαπενεμάση (κλάση D) η οποία ανιχνεύτηκε στο Εδιμβούργο σε στέλεχος που απομονώθηκε από καλλιέργεια αίματος. Η ARI-1 μετονομάστηκε αργότερα σε ΟΧΑ-23.<sup>121</sup> Η ΟΧΑ-23 έχει τυποποιηθεί σε επιδημίες από *Acinetobacter* ανθεκτικού στις καρβαπενέμες σε Βραζιλία, Κορέα και Αγγλία. Η ΟΧΑ-24 και η ΟΧΑ-40 ανιχνεύτηκαν σε επιδημίες στην Πορτογαλία και Ισπανία.<sup>122</sup> Η ΟΧΑ-58 έχει ανιχνευθεί σε κλινικά στελέχη *Acinetobacter spp* σε πολλές χώρες και στην Ελλάδα.<sup>123</sup> Η ΟΧΑ-51 έχει τυποποιηθεί σε όλα τα στελέχη *A. baumannii* ως φυσικό συστατικό του χρωμοσώματος. Οι ΟΧΑ-καρβαπενεμάσες υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες, και αναστέλλονται πτωχά από το κλαβουλανικό ενώ καθόλου από το EDTA. Υδρολύουν πενικιλίνες, 1ης και 2ης γενιάς κεφαλοσπορίνες, δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη ενώ υδρολύουν ασθενώς τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος. Αναστέλλονται καλύτερα από τη ταζομπακτάμη. Οι ΟΧΑ-48 ανιχνεύτηκαν τελευταία σε εντεροβακτηριακά (*K. pneumoniae* *E. coli*) σε πολλές χώρες (Μέση Ανατολή, Ινδία, Ευρώπη και Β. Αφρική).<sup>124</sup> Είναι δύσκολες στην ανίχνευση, διότι συχνά διατηρούν ευαισθησία στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και μονομπακτάμες, αλλά εκφράζουν ανοχή ή μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Δεν έχουν τυποποιηθεί ειδικοί αναστολείς για τις ΟΧΑ-48.

#### 2.4.2 Απώλεια πορινών

Η μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε αλλαγές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών μικροβίων έχει καταγραφεί ως ένας



σημαντικός παράγοντας αντοχής. Πρωτεϊνικά κανάλια γνωστά ως πορίνες εμπλέκονται στη μεταφορά, την πρόσληψη ή την εκροή μιας μεγάλης ποικιλίας χημικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και των διαφόρων τάξεων αντιβιοτικά.<sup>125</sup>

Οι πορίνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του περιβάλλοντος και του βακτηρίου. Οι ιδιότητες διαπερατότητας έχουν σημαντική επίπτωση στην εισροή αντιμικροβιακών παραγόντων, των υποστρωμάτων καθώς και στις αλληλεπιδράσεις με τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή.<sup>126</sup> Τα υδρόφιλα αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες, η τετρακυκλίνη, η χλωραμφαινικόλη και οι φθοριοκινολόνες χρησιμοποιούν το σχηματισμό πόρων μέσω πορινών για να αποκτήσουν πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου το οποίο και στοχεύουν, ενώ οι μακρολίδες και τα άλλα υδρόφοβα αντιβιοτικά διαχέονται διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας.<sup>127</sup> Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά που βασίζονται στην έκφραση πορινών: α) οι αλλοιώσεις της εξωτερικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένης και της απώλειας ή σοβαρής μείωσης πορινών ή ακόμα αντικατάστασης μίας ή δύο πορινών από μία άλλη, και β) η διαφοροποίηση της λειτουργίας λόγω ειδικών μεταλλάξεων που μειώνουν τη διαπερατότητα.<sup>127</sup>

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης της *K. pneumoniae* εμπλέκονται στην προστασία του βακτηριακού κυττάρου, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη διαπερατότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για την *K. pneumoniae* έχουν περιγραφεί δύο κυρίως μη ειδικές πρωτεΐνες των πόρων, δηλαδή πορίνες, των οποίων οι μοριακές μάζες, τα μεγέθη των πόρων και η αντιμικροβιακή διείσδυση των οποίων χαρακτηρίστηκαν πρώτα στο *Enterobacter cloacae*. Αυτές οι δύο πορίνες έχουν περιγραφεί ως OmpK35 και OmpK36.<sup>128</sup> Απομονώσεις κλινικών στελεχών ανθεκτικών στα περισσότερα από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων από *K. pneumoniae* είχαν κοινό χαρακτηριστικό την ταυτόχρονη έλλειψη έκφρασης των πορινών OmpK35 και OmpK36.<sup>126,129</sup> Ακόμα, η απώλεια πορινών στα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αντοχή στην κεφοξιπίνη, αυξημένη αντοχή στις τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες και τις μονοβακτάμες καθώς και μειωμένη ευαισθησία στις φθοριοκινολόνες.<sup>126,130</sup> Τέλος, σε κλινικά δείγματα στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες με μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη παρατηρήθηκε πως υπήρχε έλλειψη πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης που λειτουργούν ως κανάλια για την είσοδο αντιβιοτικών.

Για την *P. Aeruginosa*, η πορίνη της εξωτερικής μεμβράνης OprD (D2) είναι ειδική για την δίοδο των καρβαπενεμών στο μικροβιακό κύτταρο, όχι όμως και των άλλων β-λακταμικών αντιβιοτικών. Η απώλεια της πορίνης οδηγεί σε ελαττωμένη ευαισθησία της *P. aeruginosa* στις καρβαπενέμες (imipenem, meropenem, doripenem).<sup>131</sup> Σε στελέχη *P.*

*aeruginosa* με παναντοχή έχει παρατηρηθεί μαζί με την απώλεια της OprD και υπερπαραγωγή της χρωμοσωμιακής AmpC β-λακταμάσης.<sup>132</sup>

### 2.4.3 Αντλίες εκροής

Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των αντλιών που απομακρύνουν μία ή περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών από το βακτηριακό κύτταρο αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας στην μικροβιακή αντοχή. Αποτελούν πρωτεΐνες μεταφορείς που εξυπηρετούν λειτουργίες των βακτηρίων. Η λειτουργία των αντλιών αυτών, δηλαδή η μεταφορά των επιβλαβών για το κύτταρο ουσιών έξω από αυτό, αναπτύχθηκε για την επιβίωση του βακτηριακού κυττάρου. Οι αντλίες εκροής είναι είτε ειδικές για ένα υπόστρωμα είτε μη ειδικές, που λειτουργούν για ένα φάσμα δομικά ανόμοιων ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών διαφόρων τάξεων. Οι μη ειδικές αντλίες συνδέονται με την πολυανθεκτικότητα (Multi Drug Resistance-MDR).<sup>133</sup>

Η πλειοψηφία των αντλιών βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και χρησιμοποιεί κινητήρια δύναμη πρωτονίων για την αποβολή του φαρμάκου. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα συστήματα αντλιών εκροής αποτελούν μέρος ενός σπερονίου με ένα ρυθμιστικό γονίδιο, το οποίο ελέγχει την έκφραση. Παρά το γεγονός ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντλίες εκροής μπορούν να βρεθούν σε πλασμίδια, η μεταφορά τέτοιων γονιδίων στο χρωμόσωμα δίνει στο βακτήριο ενδογενή μηχανισμό που του επιτρέπει την επιβίωση του σε ένα εχθρικό περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στην παρουσία αντιβιοτικών. Με τον τρόπο αυτό, βακτήρια που υπερεκφράζουν γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση των αντλιών εκροής μπορούν να επιλεγούν χωρίς την απόκτηση νέου γενετικού υλικού. Υπερέκφραση ομόλογων γονιδίων που κωδικοποιούν τις αντλίες εκροής έχει παρατηρηθεί σε πολυανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* και *K. oxytoca*.<sup>134</sup>

Και στην *P. aeruginosa* οι αντλίες εκροής συνίστανται από 3 συστατικά, την αντλία που εδράζει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μια πόρτα εξόδου (exit portal), που διασχίζει την εξωτερική μεμβράνη και μια λιποπρωτεΐνη που συνδέει τα δύο συστατικά (linker lipoprotein). Αυξημένη έκφραση της ενεργού αντλίας εκροής του φαρμάκου (active efflux pump) καθιστά τα βακτήρια ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Μια από αυτές τις αντλίες, η MexA-MexB-OprM (efflux transporters), εκφράζεται ενδογενώς. Μεταλλάξεις οδηγούν σε αυξημένη έκφραση (Overexpression) του ενεργού συστήματος εκροής MexA-MexB-OprM και αντοχή σε όλα τα αντιψευδομονοδικά β-λακταμικά αντιβιοτικά (περιλαμβανομένης της meropenem) αλλά όχι στο imipenem.<sup>135</sup> Η αντλία MexAB-OprM εκτός από τα β-λακταμικά μπορεί να αποβάλει και αντιβιοτικά διαφορετικών κλάσεων δεν επηρεάζει όμως την

ευαισθησία στις αμινογλυκοσίδες.<sup>136</sup> Μια δεύτερη αντλία η MexC-MexD-OprJ οδηγεί σε εκλεκτική αντοχή της *P. aeruginosa*, στις κεφαλοσπορίνες 4ης γενιάς (ceferime και ceftioime) ενώ παραμένει ευαίσθητη στις άλλες κεφαλοσπορίνες.<sup>137</sup> Η αντλία MexE-MexF-OprN ενώ αναγνωρίζει φλουροκινολόνες, χλωραμφαινικόλη και τριμεθοπρίμη, δεν έχει συγγένεια με τους β-λακταμικούς παράγοντες. Αυξημένη έκφραση της MexE-MexF-OprN συνδέεται με ελαττωμένη έκφραση της OprD η οποία οδηγεί σε αντοχή στις καρβαπενέμες και φλουροκινολόνες, ενώ παραμένει ευαίσθητη στα άλλα β-λακταμικά.<sup>138</sup> Μια τέταρτη αντλία η MexX-MexY-OprM μπορεί να συνδυασθεί με OprM και πιθανά με τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης OpmB, OpmG, OpmH και OpmI και να σχηματίσει ένα τριμερές σύστημα. Οι φλουροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη και ειδικές κεφαλοσπορίνες (ceferime) αποτελούν τα υποστρώματα της αντλίας.<sup>139</sup>

#### **2.4.4 Τροποποίηση στόχου δράσης – PBPs**

Εφόσον η αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το μόριο στόχο είναι πολύ ειδική, μικρές τροποποιήσεις του μορίου – στόχου μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στη δέσμευση του αντιβιοτικού. Η τροποποίηση στόχου δράσης φαίνεται να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αντοχής στις β-λακτάμες κυρίως στα Gram (+) βακτήρια. Οι θέσεις στόχου για τις β-λακτάμες είναι οι PBPs στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μεταβολές σε PBPs μπορούν να επηρεάσουν τη συγγένεια δέσμευσής τους για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και συνεπώς την ευαισθησία του τροποποιημένου βακτηριακού κυττάρου σε αναστολή από αυτά τα αντιβιοτικά.

### 3. Επιδημιολογία – Εξάπλωση των KPC & VIM τύπου καρβαπενεμασών

Η αντοχή στις καρβαπενέμες είναι ένα από τα κυριότερα προβλήματα για τη θεραπεία λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια και η παραγωγή καρβαπενεμασών είναι ο πιο σημαντικός μηχανισμός που αναγνωρίζεται τόσο κλινικά όσο και επιδημιολογικά.<sup>140</sup>

#### KPC καρβαπενεμάσες

Το πρώτο μέλος της KPC οικογένειας ανακαλύφθηκε σε ένα κλινικό στέλεχος *K. pneumoniae* από τη Βόρεια Καρολίνα το 1996<sup>141</sup> το οποίο ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες που ελέγχθηκαν, όμως οι MICs στις καρβαπενέμες μειώνονταν παρουσία του κλαβουλανικού οξέος. Η δραστικότητα καρβαπενεμάσης σχετίστηκε με ένα μεγάλο πλασμίδιο που κωδικοποιούσε την KPC-1 β-λακταμάση.

Την ανακάλυψη της KPC-1 σύντομα ακολούθησε μια σειρά αναφορών μιας καρβαπενεμάσης που διέφερε σε ένα μόνον αμινοξύ, της KPC-2 κατά μήκος της ανατολικής ακτής των ΗΠΑ.<sup>99,142,143</sup> Η KPC-2 προσδιορίστηκε πρώτα το 2003 ως αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στην KPC-1 και εμφανίστηκε σε τέσσερα στελέχη από τη Βαλτιμόρη με MICs ιμιπενέμης 2-8mg/ml. Το γονίδιο της KPC-2 εντοπιζόταν σε ένα μεταφερόμενο πλασμίδιο και παρατηρήθηκε ότι ενώ όλα τα στελέχη παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη κανένα δεν ήταν τεχνικά ανθεκτικό σύμφωνα με τα όρια ευαισθησίας τα εγκεκριμένα από το CLSI.<sup>143</sup> Το 2004 άρχισαν να εμφανίζονται στην περιοχή της Νέας Υόρκης αναφορές για την KPC-2, με τις *K. pneumoniae* που εκφράζουν την KPC να αποτελούν ένα ανησυχητικό πρόβλημα<sup>144</sup> και αυτό γιατί η εν λόγω περιοχή είχε μεγάλες επιδημικές εξάρσεις με *Klebsiella* που παρήγαγαν ESBLs<sup>145,146</sup> για τις οποίες οι καρβαπενέμες θεωρούνταν μια από τις λίγες θεραπευτικές επιλογές.<sup>94</sup>

Παράλληλα με την αύξηση των αναφορών για την KPC-2, η KPC-3 αναφέρθηκε από μία *K. pneumoniae* που προκάλεσε επιδημία από το 2000 έως το 2001 στη Ν. Υόρκη<sup>147</sup>. Το προφίλ του ενζύμου είναι παρόμοιο με εκείνο των KPC-1 και KPC-2 με μία μικρή αύξηση στην υδρόλυση της κεφταζιδίμης.<sup>148</sup>

Μετά την ταχεία εξάπλωση της KPC κλάσης των καρβαπενεμασών κατά μήκος της ανατολικής ακτής των ΗΠΑ, άρχισαν να δημοσιεύονται αναφορές απ'όλο τον κόσμο. Μια αναφορά από τη Γαλλία το 2005 επιβεβαίωσε την ύπαρξη της KPC-2 σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* από έναν ασθενή ο οποίος είχε βρεθεί στη Ν. Υόρκη για ιατρική περίθαλψη.<sup>149</sup> Οι KPC καρβαπενεμάσες έχουν ανιχνευτεί πρόσφατα και στη Σκωτία, την Κολομβία<sup>150</sup>, το Ισραήλ<sup>151</sup>, την Κίνα<sup>152</sup> και την Ελλάδα.<sup>153</sup> Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα στα

τέλη του 2007 και τις αρχές του 2008 ο νέος μηχανισμός αντοχής στις καρβαπενέμες με παραγωγή καρβαπενεμάσης τύπου KPC εμφανίστηκε όταν δύο ασθενείς νοσηλεύτηκαν στην Ελλάδα και στη συνέχεια επέστρεψαν στις χώρες τους όπου και απομονώθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* με το νέο μηχανισμό αντοχής. Από το Φεβρουάριο έως το Δεκέμβριο του 2008, 21 νοσοκομεία στην Ελλάδα είχαν ταυτοποιήσει την παρουσία στελεχών KPC-2. Από τα 171 στελέχη που απομονώθηκαν, το 97,1% άνηκε στον ίδιο τύπο.<sup>154</sup>

Επίσης, έχει αναφερθεί και ο πρώτος εντοπισμός της KPC-2 σε πλασμίδιο στην *P. aeruginosa* γεγονός που αποτελεί μία ανησυχητική εξέλιξη στην εξάπλωση αυτής της καρβαπενεμάσης.

Τα όλο και συχνότερα περιστατικά οδήγησαν στην προσπάθεια διοργάνωσης ενεργού επιδημιολογικής επιτήρησης. Για κάθε ύποπτο στέλεχος *K. pneumoniae* γινόταν αποστολή και περαιτέρω μελέτη στο ΚΕΔΥ. Από το Φεβρουάριο του 2008 έως τον Απρίλιο του 2010, για κάθε στέλεχος γινόταν ταυτοποίηση της παραγόμενης καρβαπενεμάσης, προσδιορισμός αντοχής στα αντιβιοτικά και μοριακή τυποποίηση. Από τη μοριακή τυποποίηση προέκυψε ότι το 85% των στελεχών ανήκαν στον ίδιο τύπο (τύπος A) και ο επόμενος σε ποσοστό συχνότερος (τύπος B) ήταν εκείνος που περιελάμβανε VIM και KPC. Ακόμα, τον Ιούνιο του 2010, από όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν σε οκτώ νοσοκομεία της χώρας, ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 50% εκείνων που ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον μία ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνη παρήγαγαν καρβαπενεμάση. Στο σύνολο των καρβαπενεμασο-παραγωγών στελεχών, KPC-2 παρήγαγαν το 78%, VIM το 16,7%, ενώ ένα ποσοστό περίπου 5,3% παρήγαγαν και τις δύο καρβαπενεμάσες μαζί.<sup>155</sup>

Συμπερασματικά, στην Ελλάδα η αντοχή της *K. pneumoniae* στις καρβαπενέμες οφείλεται στην εξάπλωση δύο κυρίως μηχανισμών αντοχής, του μεταλλοενζύμου VIM, που χαρακτηρίζεται από πολυκλωνική και πλασμιδιακή διασπορά, και του ενζύμου KPC-2, που εξαπλώθηκε κυρίως με επιδημική διασπορά ενός κλώνου.<sup>146</sup>

### **VIM καρβαπενεμάσες**

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM περιγράφηκαν πρώτα στην *P. aeruginosa* και στη συνέχεια σε μία σειρά από Gram αρνητικά αζιμωτικά και σε κάποια εντεροβακτηριακά είδη, όπως *E. Coli*, *K. pneumoniae*, και *E. cloacae*. Οι τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι οι μικροοργανισμοί που παράγουν λακταμάσες τύπου VIM είναι ενδημικοί σε διάφορες Μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβάνοντας και την Ελλάδα. Η ανησυχία για την εμφάνιση των επίκτητων αυτών μεταλλο-β-λακταμασών σε κλινικά στελέχη σημαντικών Gram-

αρνητικών παθογόνων, όπως μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas*, προκύπτει από το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που μπορούν να υδρολύουν, συμπεριλαμβάνοντας και τις καρβαπενέμες, όπως και την αντίστασή τους στους αναστολείς λακταμασών.

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1997 από ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, στη Βερόνα της Ιταλίας.<sup>109</sup> Μετά την ανάλυση του υδρολυτικού προφίλ της VIM-1 διαπιστώθηκε ότι το υδρολυτικό προφίλ αυτής είναι το χαρακτηριστικό των καρβαπενεμασών τάξης B με ικανότητα υδρόλυσης των περισσότερων β-λακταμών εκτός από την αζτρεονάμη. Το γονίδιο της VIM-1 βρέθηκε να εδράζεται εντός μιας γονιδιακής κασέτας επί ενός χρωμοσωμικής εντόπισης ιντεγκρονίου τάξης I.

Αργότερα, το γονίδιο VIM-1 βρέθηκε σε ένα στέλεχος *Achromobacter xylosoxidans* στο ίδιο νοσοκομείο στη Βερόνα.<sup>156</sup> Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίαζε ανθεκτικότητα σε όλες τις β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών και έφερε ένα μη συζευκτικό πλασμιδίο, στο οποίο εδράζονταν ένα ιντεγκρόνιο τάξης I.

Εν συνεχεία, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 εντοπίστηκε σε 3 στελέχη *P. putida* απομονωθέντα από νοσοκομειακές λοιμώξεις στην Ιταλία, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα περιβαλλοντικά στελέχη αποτελούν πηγή ή τουλάχιστον φορείς γονιδίων μεταλλο-β-λακταμασών. Τα αυτά στελέχη βρέθηκε ότι έφεραν το γονίδιο της VIM-1 επί ενός πλασμιδίου.<sup>157</sup>

Έπειτα, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 ανιχνεύτηκε σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* απομονωθέντα στην Ελλάδα.<sup>158,159</sup> Ωστόσο, ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε ότι το επίπεδο ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων ποικίλει σε στελέχη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*.

Το γονίδιο VIM-2 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη νότια Γαλλία σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που είχε απομονωθεί από καλλιέργεια αίματος ενός ουδετεροπενικού ασθενή το 1996.<sup>160</sup> Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνιζε ανθεκτικότητα έναντι των περισσότερων β-λακταμών, συμπεριλαμβανομένων της κεφταζιδίμης, της κεφεπίμης και της ιμιπενέμης, αλλά παρέμενε ευαίσθητο στην αζτρεονάμη. Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 είναι στενά συγγενική με τη VIM-1 (90% αμινοξική ταυτότητα) και βρέθηκε να εδράζεται ως το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας εντός ενός ιντεγκρονίου τάξης I επί ενός μη συζευκτικού πλασμιδίου του εν λόγω στελέχους.

Ακολούθως, δύο ακόμα στελέχη *P. aeruginosa* εντοπίστηκαν στο Παρίσι που έφεραν το γονίδιο VIM-2.<sup>161</sup> Στα εν λόγω στελέχη το γονίδιο VIM-2 εδράζονταν εντός διαφορετικών ιντεγκρονίων τάξης I.

Ομοίως, στελέχη *P. aeruginosa* που παρήγαγαν τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 βρέθηκαν να είναι η πηγή επιδημικών εξάρσεων σε δύο πανεπιστημιακά νοσοκομεία στην Ιταλία και την Ελλάδα την ίδια περίοδο.<sup>114,162</sup> Στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν

μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 έχουν, επίσης, αναφερθεί και σε άλλες χώρες, όπως η Ιαπωνία, η Νότια Κορέα, η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Πολωνία, η Κροατία, η Χιλή, η Βενεζουέλα, η Αργεντινή, το Βέλγιο και πιο πρόσφατα οι Ηνωμένες Πολιτείες.<sup>108</sup> Επιπλέον, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 έχει ανιχνευθεί σε ένα στέλεχος *Citrobacter freundii* στην Ταϊβάν, σε στελέχη *S. marcescens* και στελέχη *Enterbacter cloacae* στη Νότια Κορέα.  
163,164,165

Σχετικά πρόσφατα, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 και μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση τύπου VIM, η VIM-3, έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί από στελέχη *P. aeruginosa* στην Ταϊβάν.<sup>166</sup> Η αλληλουχία αμινοξέων της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-3 διαφέρει από εκείνη της VIM-2 κατά δύο αμινοξικές υποκαταστάσεις.

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4 απομονώθηκε πρώτη φορά από ένα στέλεχος *P. aeruginosa* στη Λάρισα της Ελλάδας το 2001 από έναν ασθενή στον οποίο είχε χορηγηθεί ιμιπενέμη. Το εν λόγω στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες, αλλά διατηρούσε κάποια σχετική ευαισθησία στην αζτρεονάμη (MIC = 16 μg/ml).<sup>167</sup> Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4 διαφέρει από τη VIM-1 κατά μία απλή αμινοξική μεταβολή. Ένα ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *P. aeruginosa* που παράγει μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4, εντοπίστηκε και απομονώθηκε στη Σουηδία, από έναν ασθενή που είχε προηγουμένως νοσηλευτεί στην Ελλάδα.<sup>168</sup> Σχετικά πρόσφατα, ο Luzzaro και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν το γονίδιο VIM-4 σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* και σε ένα στέλεχος *E. cloacae* που απομονώθηκαν από έναν ασθενή το Μάιο του 2002 σε νοσοκομείο στη Βαρέζε της Ιταλίας.<sup>169</sup>

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-5 που διαφέρει από τη VIM-1 κατά 5 αμινοξικές αντικατάστασης, έχει βρεθεί σε στελέχη *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* στην Άγκυρα της Τουρκίας.<sup>170</sup> Το στέλεχος *P. aeruginosa* όπου απομονώθηκε το γονίδιο VIM-5, ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες συμπεριλαμβανομένης και της αζτρεονάμης. Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-6 που διαφέρει από τη VIM-2 κατά 2 αμινοξικές αντικατάστασης και από τη VIM-3 κατά 1 αμινοξική αντικατάσταση, έχει βρεθεί σε δύο στελέχη *P. putida* στη Σιγκαπούρη.<sup>171</sup>

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-7, που έχει βρεθεί σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* απομονωθέντα στο Χιούστον του Τέξας, εμφανίζει ταυτότητα 77% και 74% με τη VIM-1 και τη VIM-2, αντίστοιχα.<sup>172</sup> Το γονίδιο VIM-7 εντοπίστηκε σε πλασμίδιο και πιθανότατα εδράζεται σε ιντεγκρόνιο. Η εν λόγω μεταλλο-β-λακταμάση ανιχνεύτηκε σε ένα κλινικό στέλεχος ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες συμπεριλαμβανομένης της αζτρεονάμης καθώς και σε όλα τα άλλα διαθέσιμα αντιβιοτικά εκτός από τη πολυμυξίνη Β.

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-8 ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* στη Κολομβία, ενώ δύο άλλα μέλη των καρβαπενεμασών τύπου VIM, τα VIM-9 και VIM-10 ανιχνεύτηκαν

στο Ηνωμένο Βασίλειο και διαφέρουν μόνο κατά δύο αμινοξέα.<sup>173</sup> Έκτοτε, τα γνωστά μέλη των καρβαπενεμασών τύπου VIM αυξάνονται με την κατηγορία αυτών των ενζύμων να αριθμεί ήδη 37 μέλη.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Σκοπός πειραματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή και η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες σε κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*, που απομονώθηκαν το 1<sup>ο</sup> εξάμηνο του 2014 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> εξαμήνου, από τον Ιανουάριο έως και τον Ιούνιο, επιλέχτηκαν τα δέκα πρώτα για κάθε μήνα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae* και τα δέκα πρώτα αντίστοιχα στελέχη *P. aeruginosa*. Πρόκειται για στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα διαφόρων κλινικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Τα περισσότερα δείγματα για την *K. pneumoniae* προέρχονταν από τη Μ.Ε.Θ. (περί το ~50% του συνόλου των δειγμάτων), ενώ για την *P. aeruginosa* από τις Παθολογικές κλινικές (επίσης ~50% του συνόλου των δειγμάτων) του ΠΓΝ Λάρισας. Στα στελέχη που μελετήθηκαν αναζητήθηκαν γονίδια αντοχής στις καρβαπενέμες τύπου KPC και VIM.

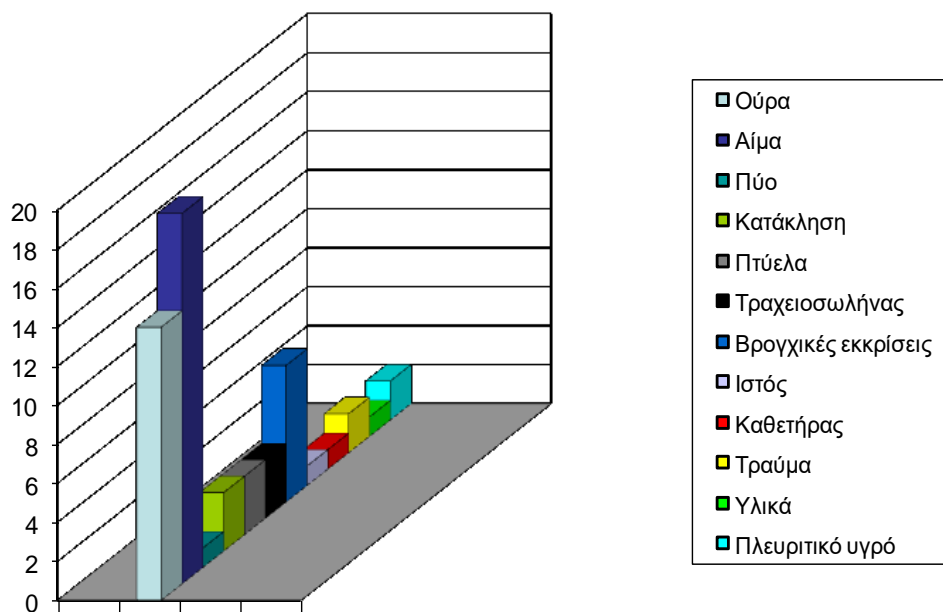
Συγκεντρωτικά λοιπόν, για την επίτευξη της μελέτης αυτής, η πειραματική διεργασία περιέλαβε:

- i. Επιλογή στελεχών *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* τα οποία είχαν προκαλέσει λοιμώξεις είτε τοπικές είτε συστηματικές στο πρώτο εξάμηνο του έτους 2014. Τα δείγματα ελήφθησαν από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο ΠΓΝ Λάρισας.
- ii. Προσδιορισμός αντοχής τους στις καρβαπενέμες με χρήση αντιβιογράμματος.
- iii. Ανίχνευση καρβαπενεμασών με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους.

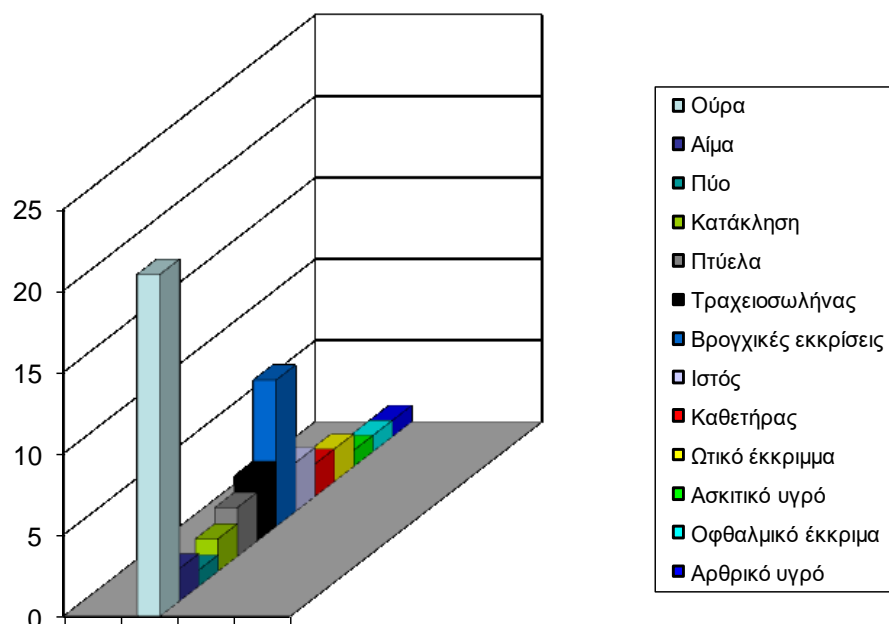
## 2. Μέθοδοι και υλικά

### 2.1 Βακτηριακά στελέχη

Στην πειραματική εργασία συμπεριελήφθησαν τα πρώτα 20 στελέχη *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, απομονωθέντα ανά μήνα το διάστημα από 01.01.2014 έως 30.06.2014. Τα στελέχη προήλθαν από ισάριθμους ασθενείς του ΠΓΝ Λάρισας. Τα κλινικά δείγματα απ'όπου απομονώθηκαν τα στελέχη ήταν ποικίλα: αίμα, βρογχικές εκκρίσεις, ούρα, πλευριτικό υγρό, ασκίτικό υγρό, ωτικό έκκριμα, καθετήρες, κατακλίσεις με σαφή υπεροχή των δειγμάτων να προέρχονται, όπως αναμένεται, από αίμα και ούρα (εικ. 12,13).



Εικόνα 12: Αριθμός απομονωθέντων στελεχών *K. pneumoniae* ανά κλινικό δείγμα.



**Εικόνα 13:** Αριθμός απομονωθέντων στελεχών *P. aeruginosa* ανά κλινικό δείγμα.

## 2.2 Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*

Η καλλιέργεια των κλινικών δειγμάτων έγινε σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey άγαρ και αιματούχο άγαρ. Μετά τον εμβολιασμό, οι καλλιέργειες επωάζονταν για 18-24h σε επωαστικό κλίβανο (Heraeus Instruments) με θερμοκρασία 37°C. Η φύλαξη των στελεχών γινόταν σε θρεπτικό ζωμό (tryptic soy broth) και η διατήρησή τους στους -80°C.

## 2.3 Ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους

Η ταυτοποίηση των στελεχών στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων (βιοχημική ταυτοποίηση και

παράλληλα χρήση εμπορικών συστημάτων αυτόματης ταυτοποίησης - Vitek System, bioMérieux).

Αρχικά, για το διαχωρισμό των μικροβίων χρησιμοποιήθηκε η χρώση Gram. Τα μικρόβια που δέχονται τη χρώση καλούνται Gram θετικά, ενώ τα μη δεχόμενα τη χρώση καλούνται Gram αρνητικά. Επιπλέον, το MacConkey άγαρ είναι εκλεκτικό και διαχωριστικό θρεπτικό υλικό. Περιέχει χολικά άλατα τα οποία επιτρέπουν την ανάπτυξη των Gram αρνητικών βακτηριδίων αλλά αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram θετικών κόκκων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο στερεό υλικό MacConkey ήταν Gram αρνητικά βακτηρίδια.

Ακολούθησαν μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών παρουσία ή απουσία ειδικών βιοχημικών δεικτών για την τυποποίηση σε επίπεδο γένους:

1. Η δοκιμασία της οξειδάσης χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα στο διαγνωστικό εργαστήριο και αποτελεί βασική μέθοδο στα αρχικά στάδια της τυποποίησης ενός βακτηρίου. Με βάση τη δοκιμασία της οξειδάσης διαχωρίζεται η οικογένεια *Pseudomonadaceae*, η οποία δίνει θετική τη δοκιμασία, από την οικογένεια *Enterobacteriaceae* που τη δίνει αρνητική.
2. Τα Gram αρνητικά βακτηρίδια που θα αναπτυχθούν διαχωρίζονται σε αυτά που διασπούν τη λακτόζη και σε εκείνα που δεν τη διασπούν. Το στερεό θρεπτικό υλικό MacConkey περιέχει το σάκχαρο λακτόζη και ένα δείκτη του pH, το ουδέτερο ερυθρό. Τα Gram αρνητικά βακτηρίδια που διασπούν τη λακτόζη εμφανίζουν κόκκινες αποικίες (ο δείκτης του pH αλλάζει χρώμα λόγω της δημιουργίας όξινων προϊόντων από τη διάσπαση της λακτόζης), ενώ εκείνα που δεν τη διασπούν εμφανίζουν άχρωμες αποικίες. Οι αποικίες της *P. aeruginosa* στο MacConkey άγαρ είναι άχρωμες και της *K. pneumoniae* είναι κόκκινες.

Συμπερασματικά, λακτόζη αρνητικές, οξειδάση θετικές μη βλεννώδεις αποικίες από το MacConkey άγαρ χαρακτηρίστηκαν ως *P. aeruginosa*, ενώ λακτόζη θετικές, οξειδάση αρνητικές βλεννώδεις αποικίες από το MacConkey άγαρ χαρακτηρίστηκαν ως *K. pneumoniae*.

Τέλος ακολούθησε η ταυτοποίηση των βακτηρίων σε επίπεδο είδους με το σύστημα Vitek-2 (bioMérieux) χρησιμοποιώντας την κάρτα GN (Gram negative) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## 2.4 Ανίχνευση επιπέδων ευαισθησίας

Ο έλεγχος ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα έγινε με τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ, ενώ ο προσδιορισμός της MIC έγινε

με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek–2 (bioMérieux, La-Balme-les-Grottes, France). Επίσης, ο έλεγχος παρουσίας καρβαπενεμασών τύπου VIM και KPC έγινε με φαινοτυπικές και μοριακές δοκιμασίες.

#### **2.4.1 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα**

##### **A. Μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ**

###### Αρχή Μεθόδου

Ο μικροοργανισμός καλλιεργείται σε όλη την επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού Mueller-Hinton agar. Πάνω στο άγαρ τοποθετούνται οι δίσκοι των αντιβιοτικών με συγκεκριμένη απόσταση ο ένας από τον άλλο. Το τρυβλίο επωάζεται για 24h και η αντιμικροβιακή ουσία διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Γύρω από το δίσκο του κάθε αντιβιοτικού παρατηρείται η ζώνη αναστολής που έχει σχηματιστεί. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής μετράται και συγκρίνεται με το μέγεθος της ζώνης αναστολής όπως προτείνεται από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ή από τη European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Το στέλεχος χαρακτηρίζεται ευαίσθητο (S), ενδιάμεσο (I) ή ανθεκτικό (R) στο συγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα.

###### Δίσκοι αντιβιοτικών

Πρόκειται για χάρτινα δισκία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένα με ορισμένη και καθορισμένη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα. Τα αντιβιοτικά που θα χρησιμοποιηθούν επιλέγονται ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού.

##### **B. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC)**

###### MIC (minimum inhibitory concentration)

Η MIC ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του. Οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται ως ευαίσθητοι ή ανθεκτικοί με βάση τα ερμηνευτικά κριτήρια της CLSI ή της EUCAST.

Ενδεικτικά τα **όρια ευαισθησίας** για τα τα εντεροβακτηριακά και την *P. aeruginosa* σύμφωνα με το CLSI (2014), παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες

**Πίνακας 2 : 2014 Interpretive Standards for *Enterobacteriaceae* (includes *Klebsiella*)**

<b>MIC(μg/mL)</b>			
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>			
<b>Αντιμικροβιακός</b>			
<b>Παράγοντας</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Ampicillin	≤8	16	≥32
Ampicillin-sulbactam	≤8/4	16/8	≥32/16
Aztreonam	≤4	8	≥16
Cefazolin(blood)	≤2	4	≥8
Cefazolin (uncomplicated UTI)	≤16		≥32
Cefepime	≤2	4-8	≥16
Ceftazidime	≤4	8	≥16
Ceftriaxone	≤1	2	≥4
Ciprofloxacin	≤1	2	≥4
Ertapenem	≤0.5	1	≥2
Fosfomycin	≤64	128	≥256
Gentamicin	≤4	8	≥16
Imipenem	≤1	2	≥4
Levofloxacin	≤2	4	≥8
Meropenem	≤1	2	≥4
Piperacillin-tazobactam	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤2/38	---	≥4/76

**Πίνακας 3 : 2014 Interpretive Standards for *Pseudomonas aeruginosa***

Αντιμικροβιακός παράγοντας	MIC(μg/mL)		
	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>R</i>
Amikacin	≤16	32	≥64
Aztreonam	≤8	16	≥32
Cefepime	≤8	16	≥32
Ceftazidime	≤8	16	≥32
Ciprofloxacin	≤1	2	≥4
Colistin/Polymixin B	≤2	4	≥8
Gentamicin	≤4	8	≥16
Imipenem	≤2	4	≥8
Levofloxacin	≤2	4	≥8
Meropenem	≤2	4	≥8
Piperacillin-tazobactam	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Ticarcillin-clavulanic acid	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
Tobramycin	≤4	8	≥16

#### 2.4.2 Φαινοτυπικές δοκιμασίες με αναστολείς

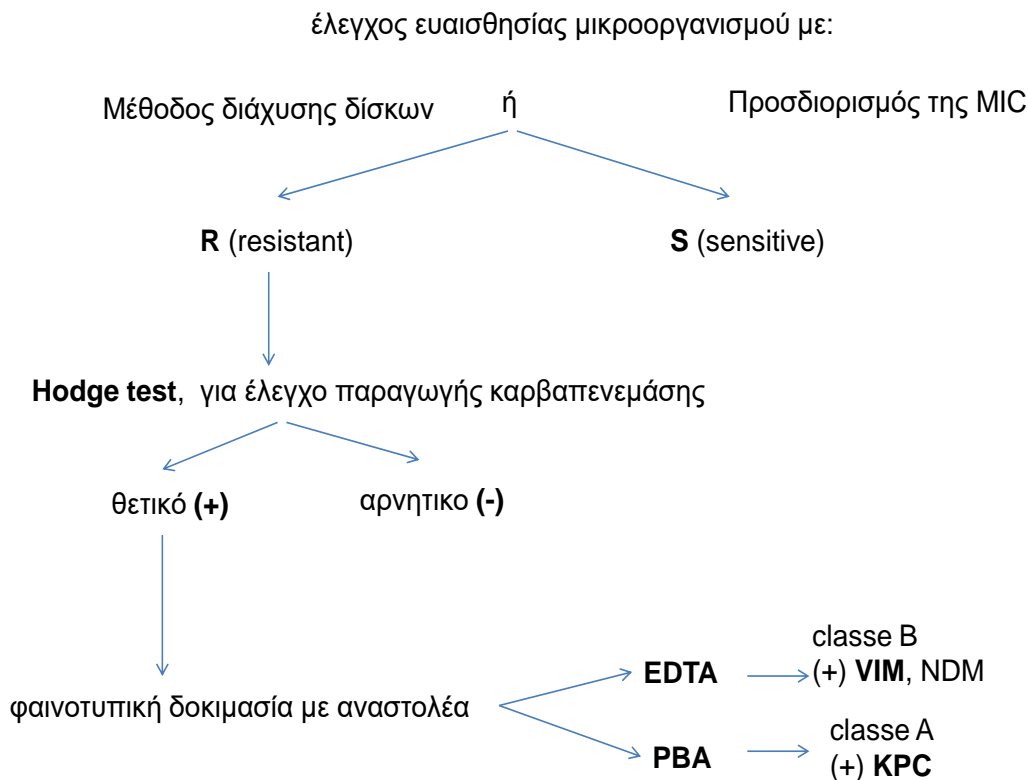
Μετά το χαρακτηρισμό ενός μικροοργανισμού ως ανθεκτικού σε καρβαπενέμες ακολουθεί ο χαρακτηρισμός του μηχανισμού αντοχής του. Η ανίχνευση της παρουσίας καρβαπενεμάσης γίνεται αρχικά με το τροποποιημένο Hodge test (modified Hodge test, MHT). Το MHT παρότι είναι εύκολη και φτηνή διαδικασία δεν παρέχει πληροφορίες για το είδος της καρβαπενεμάσης, οπότε απαιτείται διενέργεια επιπλέον φαινοτυπικών ή μοριακών μεθόδων για να εξακριβωθεί ο τύπος της, με απώλεια χρόνου και κόστους. Γι' αυτό προέκυψε η ανάγκη για την εφαρμογή ειδικών τεστ που θα επιτρέπουν γρήγορη ανίχνευση (βλέπε αλγόριθμο 1).

Για την ανίχνευση της παρουσίας καρβαπενεμάσης τύπου KPC χρησιμοποιείται ως αναστολέας το φαινυλβρορικό οξύ (phenylboronic acid, PBA). Η δοκιμασία αυτή

στηρίζεται στην αύξηση κατά 5mm της διαμέτρου αναστολής σε δίσκο μεροπενέμης όταν προστεθεί σε αυτό διάλυμα PBA, σε σύγκριση με την αναστολή γύρω από δίσκο μεροπενέμης χωρίς PBA. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην αδρανοποίηση του ενζύμου από το PBA. Η δοκιμασία αυτή συνέβαλε στη διάγνωση του πρώτου στελέχους *K. pneumoniae* που παρήγαγε καρβαπενεμάση τύπου KPC σε ελληνικό νοσοκομείο. Λίγο αργότερα αποδείχθηκε η άριστη ευαισθησία και ειδικότητά της, σε μεγάλους αριθμούς στελεχών *K. pneumoniae* με ποικιλία μηχανισμών αντοχής και εύρους MIC για τις καρβαπενέμες.

Αντίστοιχα, η ανίχνευση καρβαπενεμάσης τύπου VIM έγινε με τη χρήση ως αναστολέα του EDTA (αύξηση κατά 5mm της διαμέτρου αναστολής δίσκων μεροπενέμης, όταν προστεθεί σε αυτούς διάλυμα EDTA). Ανίχνευση στελεχών που παράγουν ταυτόχρονα KPC και VIM ένζυμα επιτυγχάνεται, όταν προστεθεί σε δίσκο μεροπενέμης ταυτόχρονα διάλυμα PBA μαζί με EDTA. Οι παραπάνω δοκιμασίες είναι απλές στην εφαρμογή και χαρακτηρίζονται από χαμηλό κόστος.<sup>153,174-176</sup>

#### Αλγόριθμος 1: αλγόριθμος παραγωγής καρβαπενεμάσης.

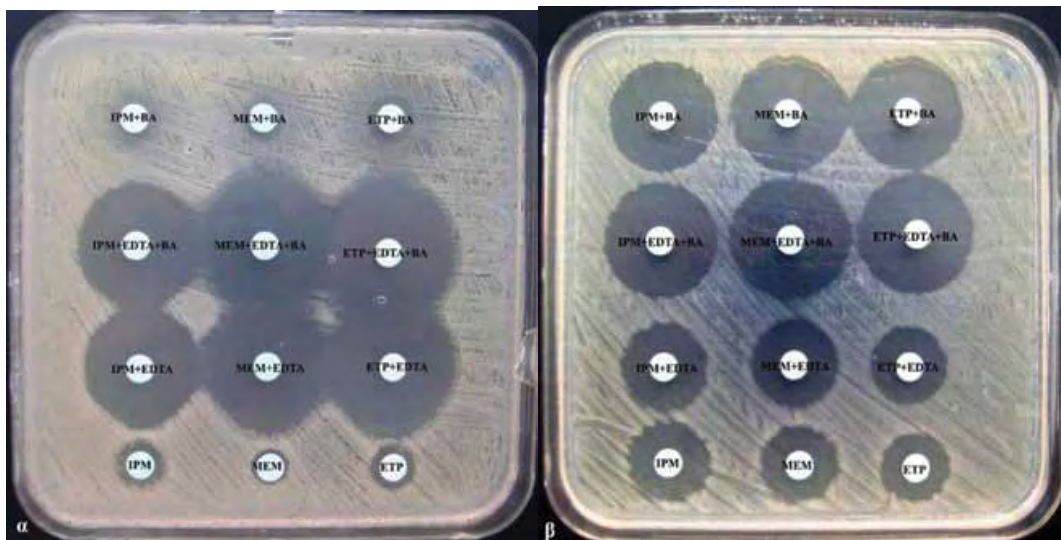


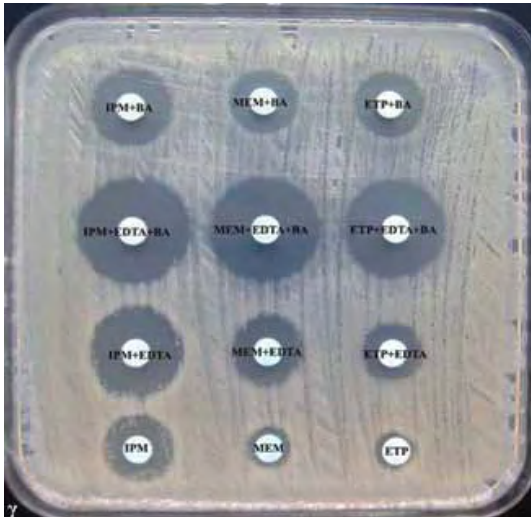


### Περιγραφή μεθόδου

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του ύποπτου για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελέχους ενοφθαλμίζεται σε Mueller-Hinton II άγαρ και τοποθετούνται επί αυτού τέσσερις δίσκοι μεροπενέμης (MEM, 10 µg, Mast group) σε απόσταση 30 mm το κέντρο του ενός από το κέντρο του άλλου. Στον ένα δίσκο μεροπενέμης δεν προστίθεται τίποτα, ο ένας δίσκος διαποτίζεται με 10 µl διαλύματος EDTA 0,1 M (Sigma-Aldrich), ο άλλος δίσκος διαποτίζεται με 20 µl διαλύματος PBA 20 mg/ml (Sigma-Aldrich) σε DMSO (Sigma-Aldrich) ενώ ο τέταρτος δίσκος διαποτίζεται με 10 µl διαλύματος EDTA 0,1M και 20 µl διαλύματος PBA 20 mg/ml σε DMSO.

Μετά από την επώαση για 18 έως 24 ώρες στους 37°C αξιολογούνται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης B, ενώ η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης A. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης A και B (εικ. 14).





**Εικόνα 14:** Ανίχνευση στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν συγχρόνως και τα δύο ένζυμα KPC και VIM με την δοκιμασία διπλού συνδυασμού των δίσκων με τους αναστολείς boronic acid (BA) και EDTA. Στην πρώτη σειρά τοποθετούνται δίσκοι imipenem (IPM), meropenem (MEM) και ertapenem (ETP) χωρίς αναστολέα, στη δεύτερη σειρά με EDTA (465 µg/δίσκο), στη τρίτη σειρά και με τους δύο αναστολείς EDTA και BA και στην τέταρτη σειρά μόνο με BA (600 µg/δίσκο).

(α) Στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει VIM. Η αύξηση της ζώνης αναστολής  $\geq 5$  mm στη 2η (IPM+EDTA, MEM+EDTA, ETP+EDTA) και 3η (IPM+EDTA+BA, MEM+EDTA+BA, ETP+EDTA+BA) σειρά δίσκων που περιέχουν EDTA σε σύγκριση με την ζώνη αναστολής των δίσκων της 1<sup>ης</sup> σειράς που δεν περιέχουν αναστολέα είναι ενδεικτική παραγωγής VIM. Η ζώνη αναστολής της 4ης σειράς δίσκων που περιέχει BA (IPM+BA, MEM+BA, ETP+BA) παραμένει αμετάβλητη.

(β) Στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει KPC. Η αύξηση της ζώνης αναστολής  $\geq 5$  mm στη 3η και 4η σειρά δίσκων που περιέχουν BA σε σύγκριση με την 1η σειρά είναι ενδεικτική παραγωγής KPC.

(γ) Στέλεχος *K. pneumoniae* που παράγει και τα δύο ένζυμα KPC και VIM. Η αύξηση της ζώνης αναστολής  $\geq 5$  mm της 3<sup>ης</sup> σειράς δίσκων (IPM+EDTA+BA, MEM+EDTA+BA, ETP+EDTA+BA) σε σύγκριση με τη ζώνη αναστολής των δίσκων της 2ης σειράς (IPM+EDTA, MEM+EDTA, ETP+EDTA) είναι ενδεικτική παραγωγής KPC, ενώ η αύξηση της ζώνης αναστολής  $\geq 5$  mm της 3ης σειράς δίσκων σε σύγκριση με τη ζώνη αναστολής των δίσκων της 4<sup>ης</sup> σειράς (IPM+BA, MEM+BA, ETP+BA) είναι ενδεικτική παραγωγής VIM (είναι εμφανής η μεγαλύτερη διάμετρος της 3ης σειράς σε σύγκριση με την 2η και 4η σειρά).

## 2.5 Απομόνωση ολικού γενωμικού DNA

Η απομόνωσή του DNA σε καθαρή μορφή αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη διεξαγωγή οποιασδήποτε διαδικασίας και συγκεκριμένα στη μελέτη μας για τη διεξαγωγή της PCR, με σκοπό την αποφυγή ουσιών που αναστέλλουν τη δράση της DNA

πολυμεράσης και καταλήγουν σε μερική ή μη ενίσχυση του προϊόντος. Οι διαδικασίες απομόνωσης ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του προϊόντος.

Ετσι: DNA extraction: είναι η διαδικασία απομόνωσης του γενωμικού υλικού ενός βιολογικού δείγματος. Στόχος του αποτελεί ο διαχωρισμός του DNA από άλλα κυτταρικά συστατικά και μακρομόρια.

Βασικά βήματα της τεχνικής αποτελούν:

1. Η λύση των κυττάρων
2. Η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων και
3. Η απομόνωση του DNA

Η απομόνωση DNA των βακτηριακών στελεχών στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε από καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey με το έτοιμο εμπορικό πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA το Quick-gDNA™ MiniPrep της Zymo Research.

#### Υλικά και Εξοπλισμός:

- i. φυγόκεντρος (mini - Spin)
- ii. vortex τύπου (BICASA, Italy)
- iii. πιπέτα (pipetman - GILSON, France)
- iv. διάλυμα φυσιολογικού ορού 0,9 % NaCl
- v. Genomic Lysis Buffer
- vi. σωλήνες συλλογής (eppendorf)
- vii. DNA pre-Wash Buffer
- viii. g-DNA wash buffer
- ix. DNA elution buffer

#### Διαδικασία

Αρχικά απομονώθηκε με κρικοφόρο στυλεό μικρή ποσότητα της καλλιέργειας βακτηρίων και έγινε επίστρωση σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey. Έπειτα ακολούθησε 24ωρη επώαση στους 37°C.

Με βακτηριολογικό κρίκο λήφθηκαν μερικές αποικίες και δημιουργήθηκε εναιώρημα σε 5ml φυσιολογικού ορού με θολερότητα ισοδύναμη με την πυκνότητα 3-4 της πρότυπης κλίμακας McFarland. Σε erpendorf μεταφέρθηκαν 200μl του εναιωρήματος. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η λύση βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων βάσει του εμπορικού πρωτοκόλλου. 500μl Genomic Lysis Buffer προστέθηκαν στο εναιώρημα με πολύ καλό

vortex και παρομονή για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε στήλες (προέρχονται από τον κατασκευαστή) οι οποίες έχουν τοποθετηθεί σε erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν στις 11.400 στροφές για 1 λεπτό. Το περιεχόμενο των erpendorfs απορρίφθηκε και οι στήλες τοποθετήθηκαν πάλι μέσα σε αυτά. Στη συνέχεια προστέθηκε 200μl Pre-wash Buffer και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.400 στροφές για 1 λεπτό. Έπειτα απορρίφθηκε το περιεχόμενο των erpendorfs, προστέθηκαν 500μl wash Buffer και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.400 για 1 λεπτό. Οι στήλες μεταφέρθηκαν σε νέα erpendorf και προστέθηκαν σε αυτές 50μl Elution buffer. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στις 14.680 στροφές. Τέλος, αποθηκεύθηκαν στους -20° C.

## **2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)**

### Αρχή μεθόδου

Το 1983 ο Kary Mullis επινόησε τη μέθοδο PCR για την ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Η τεχνική της PCR εξασφαλίζει την παραγωγή πολλών αντιγράφων ενός αρχικού τμήματος DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι να είναι γνωστή η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στις άκρες του επιθυμητού τμήματος του DNA προς αντιγραφή. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών (primers) που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.<sup>177</sup>

Επιτρέπει τον τοπικό πολλαπλασιασμό τμήματος DNA με τη βοήθεια ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και δύο ολιγομερών που περικλύουν την προς πολλαπλασιασμό περιοχή. Η αντίδραση γίνεται αυτόματα και οδηγεί σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών στη λήψη ικανοποιητικής ποσότητας DNA για περαιτέρω μελέτη. Είναι σύντομη από άποψη χρονικής διάρκειας, μη δαπανηρή, εύκολη στην εφαρμογή της και επιτρέπει τη λήψη ποσότητας μικρογραμμαρίων DNA από αρχικό υλικό, δηλαδή απειροελάχιστης ποσότητας. Η όλη διαδικασία επιτυγχάνεται σε τρεις αντιδράσεις, αποδιάταξη DNA, υβριδισμός ολιγομερών και σύνθεση DNA, που εκτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία και αποτελούν έναν κύκλο. Η διαδικασία των κύκλων επιτελείται αυτόματα σε μηχανήμα που ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής.

Για μια τυπική αντίδραση PCR απαιτείται: αποστειρωμένο νερό, PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, μείγμα dNTPs, εκκινητές, Ταq DNA πολυμεράση και γενωμικό DNA.

Χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση των βακτηρίων που ζουν σε περιβάλλον 70-80°C και μπορεί να παραμείνει λειτουργική μετά από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες. Το

πρώτο θερμοανθεκτικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση από το όνομα του βακτηρίου *Thermus aquaticus* από το οποίο απομονώθηκε.

Το  $MgCl_2$  είναι απαραίτητο για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση  $MgCl_2$  αυξάνει και η δραστηριότητα του ενζύμου και η παραγωγή προϊόντος. Ωστόσο σε αυξημένες συγκεντρώσεις υπάρχει κίνδυνος παραπροϊόντων λόγω μείωσης της ειδικότητας του ενζύμου. Ακόμα υπάρχει σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των dNTPs και του  $MgCl_2$  διότι τα dNTPs δεσμεύουν και αυτά Mg. Οπότε σε αυξημένες συγκεντρώσεις dNTPs χρειάζονται αυξημένες  $MgCl_2$  αλλιώς αναστέλλεται η πολυμεράση.

Οι εκκινητές δεν αρκεί να είναι συμπληρωματικοί στα άκρα του τμήματος DNA που αντιγράφεται, αλλά πρέπει συγχρόνως να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με άλλες θέσεις μορίων DNA που περιέχονται στο διάλυμα της αντίδρασης. Αυτό διότι υπάρχει περίπτωση να αντιγράφεται και άλλο τμήμα DNA παράλληλα οπότε θα μειωθεί η αποτελεσματικότητα της αντιγραφής του επιθυμητού τμήματος και πλέον θα εμφανίζονται παραπροϊόντα.

Ένας κύκλος PCR αποτελείται από τρία βήματα:

i) Αποδιάταξη αλυσίδων (denaturation) όπου οι δύο αλυσίδες του γονικού μορίου DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση της αντίδρασης. Σε υψηλή θερμοκρασία οι αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται καθώς καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου και αποχωρίζονται οι δύο συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες αλυσίδες.

ii) Υβριδισμός εκκινητών (annealing of primers) όπου η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται ώστε να είναι δυνατή η αναδιάταξη και να επιτραπεί ο υβριδισμός κάθε εκκινητή σε μία αλυσίδα DNA. Ο ένας εκκινητής προσδένεται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας της επιθυμητής αλληλουχίας και ο άλλος στο 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας της επιθυμητής αλληλουχίας.

iii) Επιμήκυνση DNA (DNA extension) όπου η αντίδραση θερμαίνεται σε θερμοκρασία βέλτιστη για την Taq DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό επιμηκύνει τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της επιθυμητής αλληλουχίας καθώς η σύνθεση DNA έχει κατεύθυνση 5'-3'. Έτσι γίνεται σύνθεση αλυσίδας DNA συμπληρωματικής της προϋπάρχουσας.

Τα νεοσυντιθέμενα δίκλινα μόρια θερμαίνονται για να αρχίσει ο δεύτερος κύκλος. Η διαδικασία κάθε κύκλου επαναλαμβάνεται πολλές φορές με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του επιθυμητού γονιδίου.<sup>178</sup>

### Υλικά και Εξοπλισμός:

#### i. DNA

- ii. erpendorfs
- iii. ρυθμιστικό διάλυμα
- iv. MgCl<sub>2</sub>
- v. αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O
- vi. εκκινητές
- vii. πιπέτες (pipetman - GILSON, France)
- viii. φυγόκεντρος (mini - Spin)
- ix. θερμοκυκλοποιητής (BIO-RAD DNA Engine Petier Thermal Cycller)
- x. Taq πολυμεράση
- xi. dNTP's

### Διαδικασία

Για την αντίδραση PCR προετοιμάστηκε διάλυμα το οποίο περιείχε H<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, το ζεύγος εκκινητών ( forward, reverse ) και Taq πολυμεράση. Στη συνέχεια το διάλυμα μοιράστηκε σε erpendorfs από 22,5μl και προστέθηκε 2,5μl DNA από κάθε δείγμα DNA των βακτηριακών στελεχών. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25 μl. Στην PCR χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O ως αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή ένα δείγμα επιπλέον που δεν περιείχε DNA.

Για την ανίχνευση του γονιδίου της καρβαπενεμάσης KPC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και το ζεύγος εκκινητών με τις ακόλουθες αλληλουχίες:

*bla*<sub>KPC</sub> F: 5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3' και

*bla*<sub>KPC</sub> R: 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3'.

Το μέγεθος της περιοχής ενίσχυσης των παραπάνω εκκινητών είναι 780 bp.

Η σύνθεση του μείγματος της PCR αντίδρασης, καθώς και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης αναφέρονται στους πίνακες 4 και 5 αντίστοιχα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10xTaq Buffer με KCl	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5
Μείγμα dNTPs (20mM)	0.5
Primer <i>bla</i> <sub>KPC</sub> F (25pmol/μL)	0.25
Primer <i>bla</i> <sub>KPC</sub> R (25pmol/μL)	0.25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.2

WFI	17.3
DNA <i>K.pneumoniae</i>	2.5
Τελικός όγκος	25

**Πίνακας 4:** Σύθεση μείγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβεπενεμάσης KPC.

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95°C για 5min
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 30sec
<b>Αναδιάταξη</b>	55°C για 30sec
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1min
<b>Αριθμός κύκλων</b>	30
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5min

**Πίνακας 5:** Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης για την ανίχνευση γονιδίων καρβεπενεμάσης KPC.

Για την ανίχνευση του γονιδίου της καρβαπενεμάσης VIM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων με τις εξής αλληλουχίες:

*bla<sub>VIM</sub>* F: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACA-3' και

*bla<sub>VIM</sub>* R: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'.

Το μέγεθος της περιοχής ενίσχυσης των παραπάνω εκκινήτων είναι 261 bp.

Η σύθεση του μείγματος της PCR αντίδρασης, καθώς και οι θερμικές συνθήκες κυκλοποίησης αναφέρονται στους πίνακες 6 και 7 αντίστοιχα.

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)</b>
10xTaq Buffer με KCl	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5
Μείγμα dNTPs (20mM)	0.5
Primer <i>bla<sub>VIM</sub></i> F (25pmol/μL)	0.25
Primer <i>bla<sub>VIM</sub></i> R (25pmol/μL)	0.25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0.2
WFI	17.3
DNA <i>P. aeruginosa</i>	2.5
Τελικός όγκος	25

**Πίνακας 6:** Σύνθεση μείγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση γονιδίων καρβεπενεμάσης VIM.

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C για 5min
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1min
<b>Αναδιάταξη</b>	56°C για 1min
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1min
<b>Αριθμός κύκλων</b>	35
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 1min

**Πίνακας 7:** Συνθήκες θερμικής κυκλοποίησης για την ανίχνευση γονιδίων καρβεπενεμάσης VIM.

## 2.7 Ηλεκτροφόρηση

### Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια μέσα σε υδατίνα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών τους φορτίων και μαζών τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες. Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από τη σταθερά  $pK$  και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το  $pH$ , η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση. Η καθιερωμένη τεχνική για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από D-γαλακτόζη και από ομάδες της 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης. Η αγαρόζη που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 1,8%.

Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από: το μοριακό μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση αγαρόζης, τη μορφή του DNA, την τάση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος και τις χρωστικές που ενσωματώνονται στο DNA.

Για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα διαλύματα φόρτωσης και ηλεκτροφόρησης:



Διάλυμα φόρτωσης: Στα διαλύματα του DNA πριν την ηλεκτροφόρηση προστίθεται ένα πυκνότερο διάλυμα με τις εξής ιδιότητες: περιέχει χρωστικές που κατά την ηλεκτροφόρηση σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αγαρόζης μετακινούνται παράλληλα με κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους. Με αυτόν το τρόπο παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης του βαθμού της μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα με την πάροδο του χρόνου. Ακόμη επειδή χρωματίζεται το διάλυμα του DNA είναι πιο εύκολη η τοποθέτηση του στις αντίστοιχες θέσεις του πηκτώματος. Επιπλέον το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη η οποία εξ αιτίας του μεγάλου ιξώδους καταστεί δυνατή την τοποθέτηση του διαλύματος DNA στον πάτο των θέσεων του πηκτώματος.

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης: Τα διαλύματα ηλεκτροφόρησης παρέχουν την ανάλογη ιονική ισχύ που χρειάζεται για να γίνει ηλεκτροφόρηση. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι TBE (tris-βορονικό EDTA) σε συγκέντρωση 0,5x.

#### Υλικά και Εξοπλισμός:

- i. σκόνη αγαρόζης (Lonza – SeaKem® LE Agarose)
- ii. φαρμακευτικός ζυγός
- iii. διάλυμα TBE 0,5x
- iv. συσκευή ηλεκτροφόρησης
- v. πιπέτες ( Pipetman® –GILSON, France)
- vi. δείκτης γνωστών μοριακών βαρών Gene Ruler 100bp DNA ladder, 0.1μg/ml Invitrogen
- vii. χρωστική DNA loading dye
- viii. τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Bio – Imaging systems – Mini BIS Pro)

#### Διαδικασία

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης περιλαμβάνει την (i) την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης και (ii) την ηλεκτροφόρηση.

Το διάλυμα φόρτωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι 6x Loading Dye Solution, Fermentas.

#### Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης x 2% :

Σε κωνική φιάλη διαλύεται 1g αγαρόζης σε 50 mL TBE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 λεπτά. Στο μείγμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο και εν συνεχεία εκχύεται στο εκμαγείο τοποθετώντας και την ειδική χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων. Αφήνεται μέχρι να σταθεροποιηθεί και έπειτα αφαιρείται η χτένα. Το πήκτωμα βυθίζεται

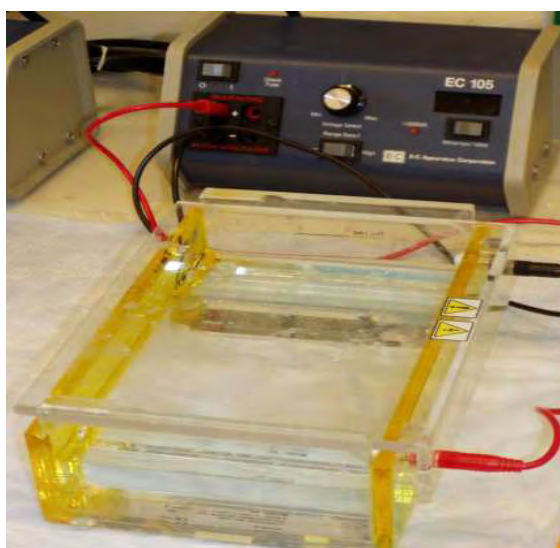
στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα TBE και με τα φρεάτια προς στον αρνητικό πόλο.

#### Ηλεκτροφόρηση:

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε 2% (w/v) πηκτώματος αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x.

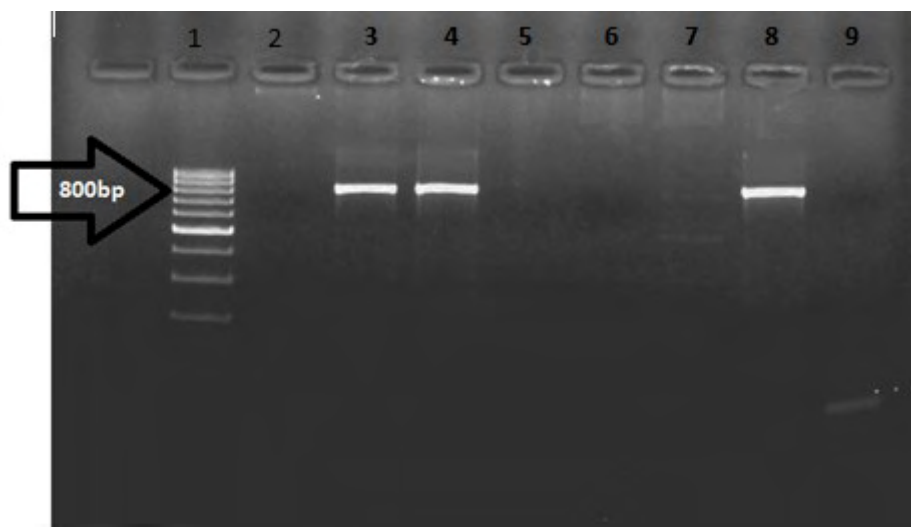
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε υπό τάση 100-120V σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (εικ. 15). Ως πρότυπο αναφοράς στις ηλεκτροφορήσεις σε πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης γνωστών μοριακών βαρών Gene Ruler 100bp DNA Ladder 0.1 µg/ml Invitrogen.

Μετά το τέλος των αντιδράσεων της PCR αναμίχθηκαν 6µl από το προϊόν της PCR μαζί με 1µl χρωστικής για κάθε δείγμα. Τα δείγματα προστέθηκαν στα φρεάτια του πηκτώματος, τοποθετώντας ένα δείγμα σε κάθε φρεάτιο. Στο πρώτο φρεάτιο τοποθετήθηκε δείκτης γνωστού μοριακού μεγέθους για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των δειγμάτων, των θετικών και αρνητικών μαρτύρων μετά την ηλεκτροφόρηση. Όταν η διαδικασία ολοκληρώθηκε το πήκτωμα αγαρόζης απομακρύνθηκε από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετήθηκε σε τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. Το DNA οπτικοποιείται με τη μορφή ζωνών γεγονός που οφείλεται στη δέσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου το οποίο φθορίζει υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, στο DNA. Ακολούθησε απεικόνιση των αποτελεσμάτων μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή.



**Εικόνα 15:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Στις παρακάτω εικόνες (εικ. 16,17) παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

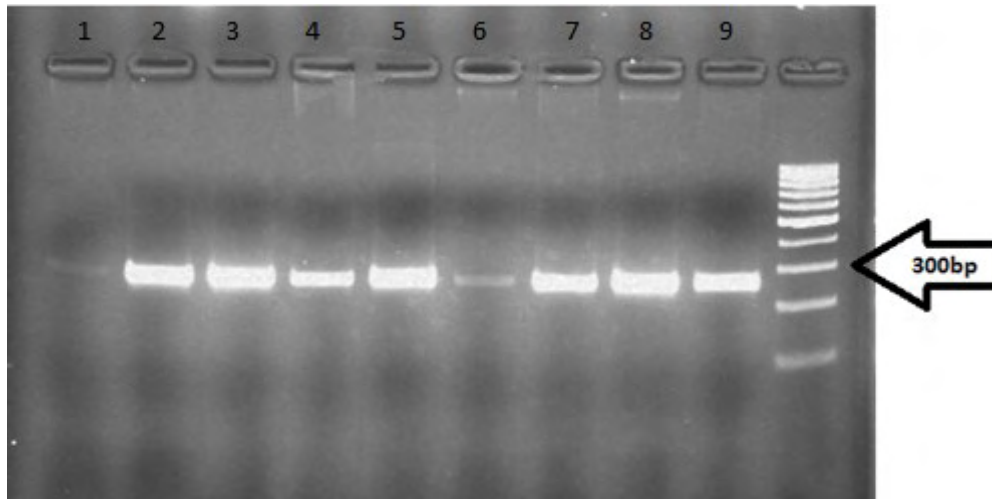


**Εικόνα 16:** Εικόνα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο KPC. ( Δείγμα 3,4: θετικά για KPC, 9: αρνητικός μάρτυρας, 8: θετικός μάρτυρας ).

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα των προϊόντων του γονιδίου KPC.

Στο πρώτο φρεάτιο τοποθετήθηκε ο δείκτης γνωστών μοριακών βαρών, στο δεύτερο- τρίτο-τέταρτο-πέμπτο-έκτο και έβδομο φρεάτιο τοποθετήθηκαν τα δείγματα, ενώ στο ένατο ο αρνητικός μάρτυρας και στο όγδοο ο θετικός αντίστοιχα.

Παρατηρείται ζώνη μεγέθους 800 bp γεγονός που συμβαδίζει με το αναμενόμενο προϊόν του γονιδίου. Συμπεραίνουμε ότι το τρίτο και το τέταρτο στελέχος έχουν το γονίδιο KPC και πως το διάλυμα master mix δεν έχει επιμολυνθεί καθώς η διαδρομή του αρνητικού μάρτυρα δεν παρουσιάζει καμία ζώνη.



**Εικόνα 17:** Εικόνα ηλεκτροφόρησης για το γονίδιο VIM. ( Δείγμα 3,4,5,7,8,9: θετικά για VIM, 1: αρνητικός μάρτυρας, 2: θετικός μάρτυρας ).

Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα των προϊόντων του γονιδίου VIM.

Στο τελευταίο φρεάτιο έχει τοποθετηθεί ο δείκτης γνωστών μοριακών βαρών, στο πρώτο ο αρνητικός μάρτυρας, στο δεύτερο ο θετικός αντίστοιχα και στο τρίτο-τέταρτο-πέμπτο-έκτο-έβδομο-όγδοο και ένατο φρεάτιο τοποθετήθηκαν τα δείγματα.

Παρατηρείται ζώνη μεγέθους 300 bp γεγονός που συμβαδίζει με το αναμενόμενο προϊόν του γονιδίου. Συμπεραίνουμε ότι μόνον το έκτο στέλεχος δεν έχει το γονίδιο VIM και ότι ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης επιβεβαιώνει ότι το διάλυμα πριν την εισαγωγή του DNA (master mix) δεν είναι μολυσμένο καθώς η διαδρομή του αρνητικού μάρτυρα δεν παρουσιάζει καμία ζώνη.

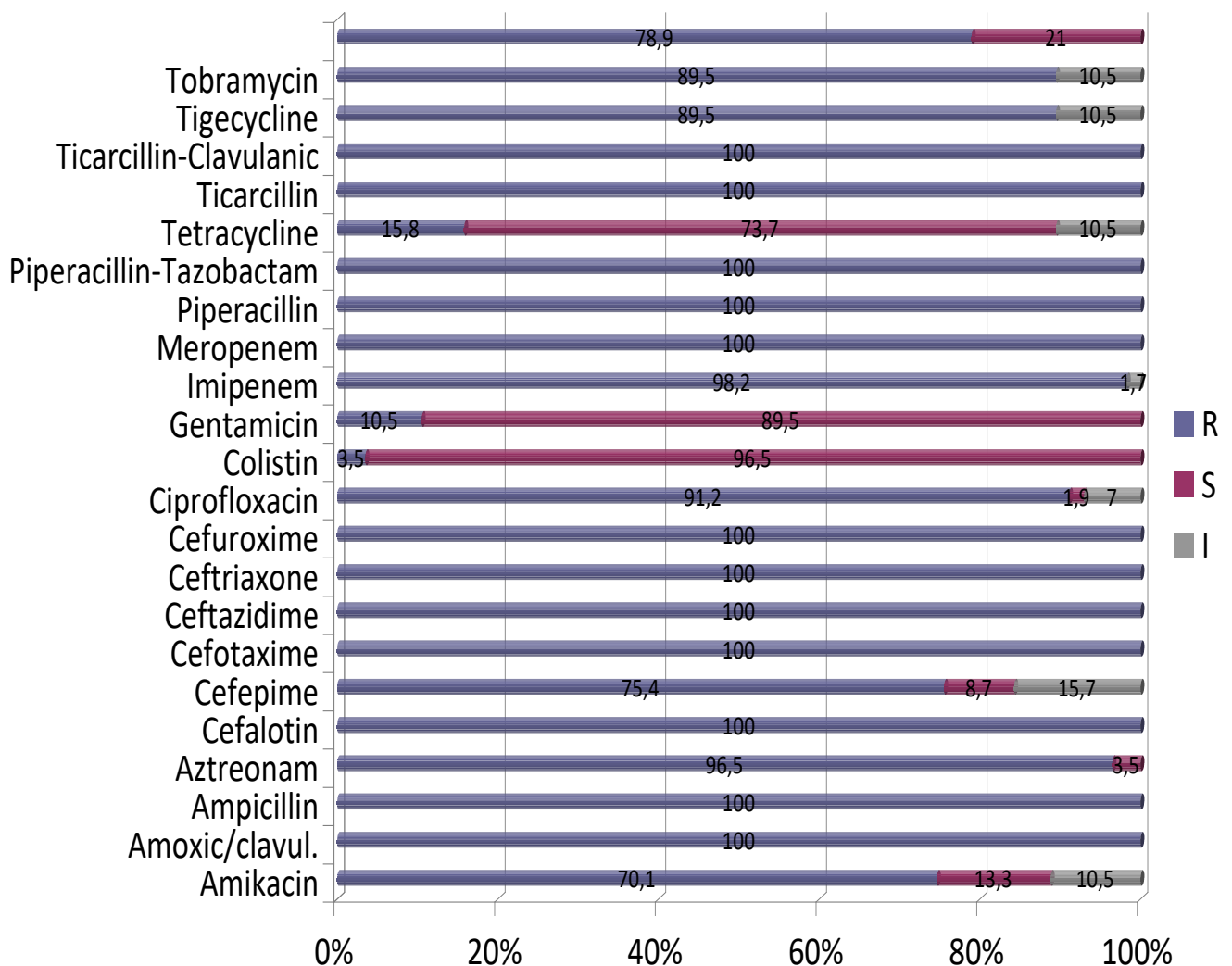
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Αποτελέσματα από δοκιμασίες ανίχνευσης των επιπέδων ευαισθησίας

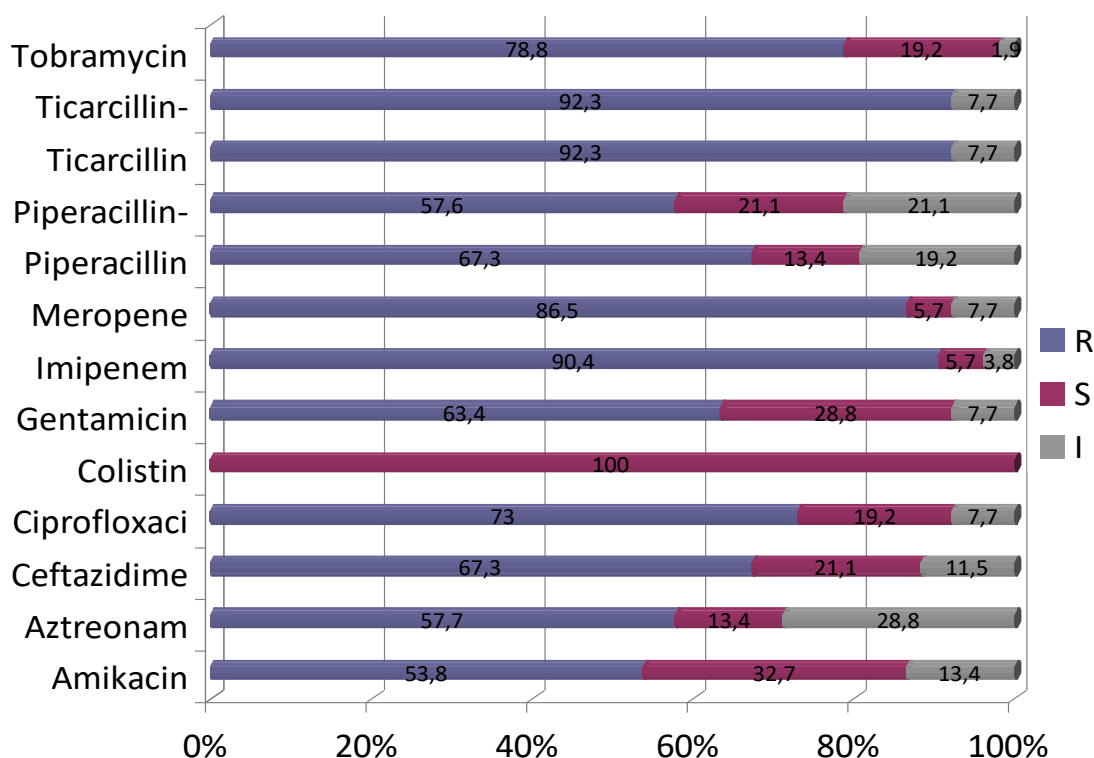
Στα πλαίσια των δοκιμασιών ανίχνευσης των επιπέδων ευαισθησίας πραγματοποιήθηκαν αντιβιογράμματα για κάθε στέλεχος τόσο για τα β-λακταμικά όσο και για τα μη λακταμικά αντιβιοτικά καθώς και φαινοτυπικές δοκιμασίες με αναστολείς.

Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αντιβιογράμματα στελεχών *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Γράφημα 1 : αντιβιογράμματα στελεχών *K. pneumoniae*.



**Γράφημα 2 :** αντιβιογράμματα στελεχών *P. aeruginosa*.



### Αποτελέσματα φαινοτυπικού και μοριακού ελέγχου γονιδίων αντοχής

Για τη μοριακή ανίχνευση των γονιδίων KPC και VIM εξετάστηκαν δείγματα τα οποία συγκεντρώθηκαν το πρώτο εξάμηνο του έτους 2014 και προέρχονταν από τις κλινικές του ΠΓΝΛάρισας. Συγκεκριμένα κάθε μήνα συλλέγονταν τα πρώτα 20 στελέχη *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa*, ανθεκτικών στις καρβαπενέμες όπως προέκυπτε από το αντιβιογράμμα τους.

Για κάθε στέλεχος *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* έγινε η δοκιμασία Hodge Test για έλεγχο παρουσίας καρβαπενεμάσης και οι δοκιμασίες αναστολής με τη χρήση βορονικού οξέος και EDTA για το χαρακτηρισμό τους. Στη συνέχεια έγινε ανίχνευση των αντίστοιχων γονιδίων VIM και KPC με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αναφορικά για την *K. pneumoniae* συλλέχθηκαν 57 στελέχη εκ των οποίων τα 37 προέρχονταν από άντρες ενώ τα 20 από γυναίκες και για την *P. aeruginosa* μελετήθηκαν 52 στελέχη εκ των οποίων τα 36 προέρχονταν από άνδρες και τα 14 από γυναίκες.

## KLEBSIELLA PNEUMONIAE

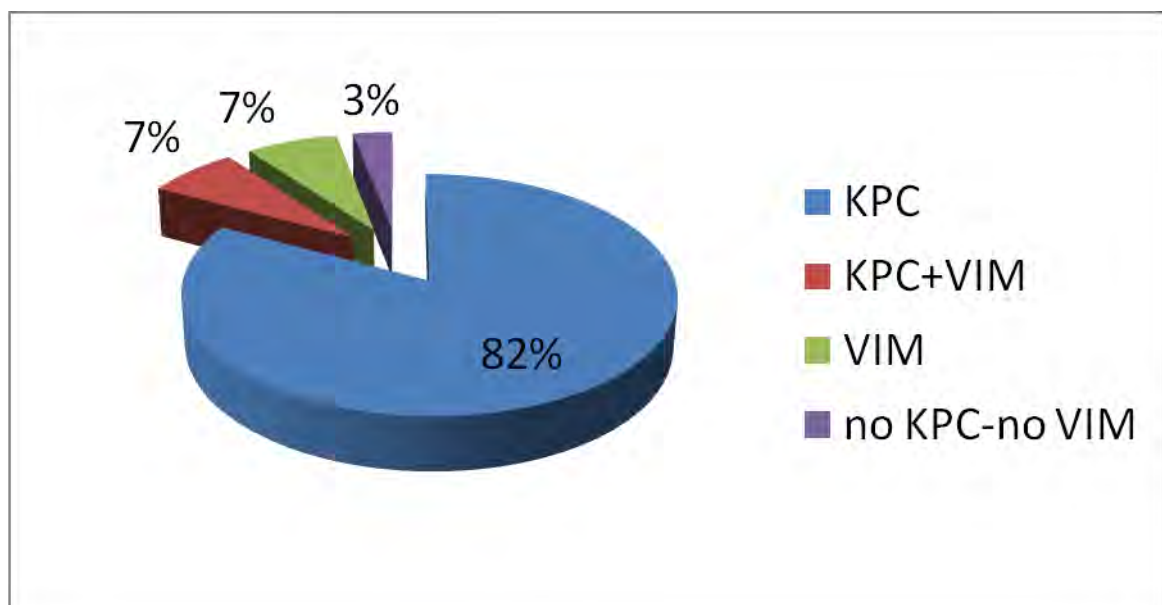
Από το σύνολο των 57 στελεχών με αντοχή σε καρβαπενέμες το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* ανιχνεύθηκε σε 51 στελέχη. Τα συγκεκριμένα στελέχη είχαν θετική δοκιμασία αναστολής με την προσθήκη βορονικού οξέος. Με άλλα λόγια σε 51 στελέχη από το σύνολο των 57 που εξετάστηκαν τα αποτελέσματα ανίχνευσης του γονιδίου *bla<sub>KPC</sub>* συμφωνούσαν απόλυτα με τη φαινοτυπική μέθοδο αναστολής. Μεταξύ αυτών των στελεχών 4 είχαν θετική και τη δοκιμασία αναστολής με EDTA. Τα εν λόγω στελέχη ήταν θετικά στον έλεγχο ύπαρξης VIM γονιδίου συνοδά με την ύπαρξη του KPC.

Από τα υπόλοιπα στελέχη σε 4 υπήρξε ταυτόσημο αλλά αρνητικό αποτέλεσμα, δηλαδή ΔΕΝ ανιχνεύθηκε το γονίδιο KPC με την PCR αλλά ούτε και φαινοτυπικά διαπιστώθηκε ύπαρξη καρβαπενεμάσης τάξης A. Στα συγκεκριμένα στελέχη επειδή ήταν θετική η δοκιμασία με τη χρήση EDTA, αναζητήθηκε και ανιχνεύθηκε με PCR το γονίδιο VIM.

Μόνον σε 2 στελέχη υπήρξε απόκλιση της φαινοτυπικής από τη μοριακή μέθοδο. Στα συγκεκριμένα ενώ η δοκιμασία αναστολής με τη χρήση βορονικού οξέος ήταν θετική, η PCR δεν ανίχνευσε γονίδιο KPC στα συγκεκριμένα στελέχη.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στο σύνολο των στελεχών της συγκεκριμένης μελέτης η μοριακή και η φαινοτυπική μέθοδος είχαν όμοια αποτελέσματα σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι καρβαπενεμάσης σε ποσοστό 96,5%, ενώ σε ποσοστό 3,5% υπήρξε απόκλιση του αποτελέσματος.

Συγκεντρωτικά, σε 47 στελέχη ανιχνεύθηκε το γονίδιο KPC (82%), σε 4 ανιχνεύθηκαν και τα δύο γονίδια KPC και VIM (7%), σε 4 μόνο το γονίδιο VIM (7%), ενώ 2 στελέχη δεν έφεραν κανένα από τα δύο γονίδια (3%) (εικ. 18).



**Εικόνα 18:** Στελέχη *K.pneumoniae*: ποσοστά καρβαπενεμασών.

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA

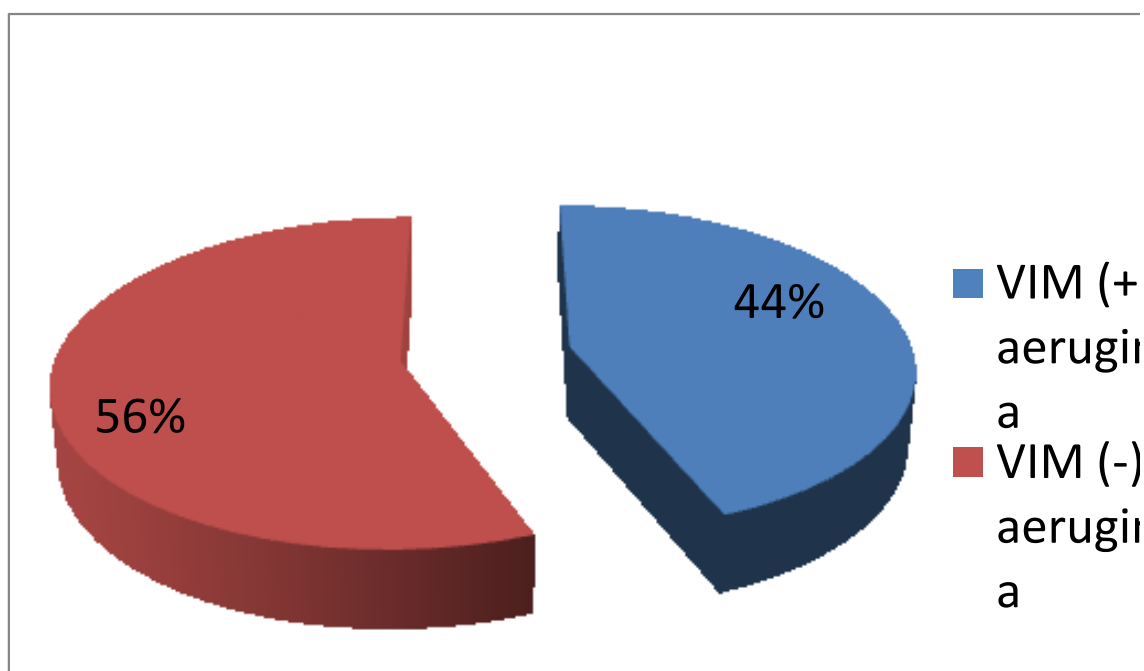
Από το σύνολο των 52 στελεχών βρέθηκε να φέρουν το γονίδιο *bla<sub>VIM</sub>* 23 στελέχη τα οποία είχαν δώσει θετική τη δοκιμασία αναστολής με EDTA.

Επιπλέον σε 12 στελέχη τα οποία είχαν θετική φαινοτυπική δοκιμασία με EDTA η ανίχνευση του γονιδίου VIM ήταν αρνητική. Υπάρχει συνεπώς απόκλιση της φαινοτυπικής και της μοριακής μεθόδου ανίχνευσης του γονιδίου, γεγονός που αντιστοιχεί σε ποσοστό 23% του συνόλου των στελεχών. Συγκεκριμένα, στα στελέχη αυτά η φαινοτυπική μέθοδος ήταν θετική για παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης ενώ δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο VIM με μοριακές μεθόδους.

Τέλος, 17 στελέχη στα οποία η δοκιμασία αναστολής με EDTA ήταν αρνητική δεν έφεραν το γονίδιο VIM. Στα στελέχη αυτά ο μηχανισμός αντοχής σχετιζόταν είτε με μηχανισμό αντλίας είτε με τροποποίηση πορινών.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στο σύνολο των στελεχών της συγκεκριμένης μελέτης η μοριακή και η φαινοτυπική μέθοδος είχαν όμοια αποτελέσματα σε σχέση με την ανίχνευση ή όχι καρβαπενεμάσης σε ποσοστό 77%.

Συγκεντρωτικά, το γονίδιο VIM ανιχνεύθηκε σε 23 στελέχη (44%), ενώ 29 στελέχη ήταν αρνητικά για την ύπαρξη του γονιδίου (56%) (εικ. 19).



Εικόνα 19: Στελέχη *P.aeruginosa*: ποσοστά καρβαπενεμασών.



## Προσδιορισμός ευαισθησίας και ειδικότητας των φαινοτυπικών μεθόδων

Ο υπολογισμός των παραμέτρων αξιολόγησης της μεθόδου έγιναν σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους:

Ευαισθησία (sensitivity)	TP	X100
	TP+FN	
Ειδικότητα (specificity)	TN	X100
	TN+FP	

TP=true positive=αληθώς θετικό αποτέλεσμα

TN=true negative=αληθώς αρνητικό αποτέλεσμα

FN=false negative=ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα

FP=false positive=ψευδώς θετικό αποτέλεσμα

### ❖ προσδιορισμός ευαισθησίας και ειδικότητας του τεστ βορονικού οξέος

Η απόδοση του τεστ δισκίων βορονικού οξέος για την ανίχνευση των KPC ενζύμων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την PCR ως πρότυπη μέθοδο. Για κάθε τεστ υπολογίστηκε η ευαισθησία από τον αριθμό των KPC στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά, ενώ η ειδικότητα υπολογίστηκε από τον αριθμό των αρνητικών για KPC στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά.

Ετσι, σύμφωνα με τα παραπάνω η ευαισθησία της μεθόδου αγγίζει το 100% εφόσον :

ευαισθησία= $(51/51+0) \times 100\% = 100\%$  και η ειδικότητα= $(4/4+2) \times 100\% = 66,6\%$ .

### ❖ προσδιορισμός ευαισθησίας και ειδικότητας του τεστ EDTA

Και πάλι ως πρότυπη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε η PCR. Όπως και παραπάνω η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε από τον αριθμό των VIM στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά, ενώ η ειδικότητα από τον αριθμό των αρνητικών για VIM στελεχών που προσδιορίστηκαν σωστά.

Συγκεκριμένα, η ευαισθησία της μεθόδου πάλι αγγίζει το 100% εφόσον  $\text{ευαισθησία} = (23/23+10) \times 100 = 100\%$  και η ειδικότητα  $= (30/30+12) \times 100 = 71.4\%$ .

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε παγκόσμια κλίμακα. Η παγκόσμια κατανάλωση των αντιβιοτικών έχει αυξηθεί δραματικά και παράλληλα έχουν αυξηθεί τα ποσοστά της μικροβιακής αντοχής σε τέτοια επίπεδα ώστε να υπάρχουν είδη μικροβίων για τα οποία δεν υπάρχει κανένα διαθέσιμο δραστικό φάρμακο.

Τα αντιβιοτικά διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, μηχανισμό που ακολουθούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία είναι τα πιο δραστικά και ευρέως χρησιμοποιούμενα. Στην ομάδα των β-λακταμών περιλαμβάνονται οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι κεφαμυκίνες, οι μονοβακτάμες, οι καρβαπενέμες και οι αναστολείς των β-λακταμασών. Την εισαγωγή τους όμως στην αντιμικροβιακή θεραπεία γρήγορα ακολούθησε η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά.

Η αντοχή είναι αποτέλεσμα της εξελικτικής πορείας των μικροοργανισμών και επιτυγχάνεται είτε μέσω αυτόματων μεταλλαγών στο γονιδίωμά τους είτε με απόκτηση νέου γενετικού υλικού μέσω γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεργκρόνια, τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν πληροφορίες για αντοχή σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών. Οι γενετικές αυτές αλλαγές δεν είναι συνήθη φαινόμενα, μπορεί όμως να συμβούν, ενώ οι μικροοργανισμοί που μεταφέρουν τέτοιου είδους γενετικές πληροφορίες, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, βρίσκονται σε πλεονεκτική θέση και επικρατούν έναντι άλλων που δεν περιέχουν μηχανισμούς αντοχής.

Ενα από τα μεγαλύτερα προβλήματα για τη δημόσια υγεία σήμερα αποτελεί η εξάπλωση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram αρνητικών μικροβίων. Συνήθως τα ανθεκτικά μικρόβια στις καρβαπενέμες εμφανίζουν παράλληλα αντοχή (co-resistance) και σε άλλες ομάδες αντιμικροβιακών. Η αντοχή στις καρβαπενέμες οφείλεται κυρίως στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, των καρβαπενεμασών. Η ταχεία εξάπλωση των καρβαπενέμη-ανθεκτικών μικροβίων οφείλεται 1) στην ευρεία χρήση των καρβαπενεμών στο νοσοκομειακό περιβάλλον, 2) στη δυνατότητα των υπεύθυνων γονιδίων των Gram αρνητικών βακτηρίων να μεταφέρονται τόσο σε διαφορετικά είδη όσο και σε διαφορετικούς κλώνους του ίδιου είδους και 3) στη μη τήρηση μέτρων υγιεινής των χεριών από το νοσηλευτικό και ιατρικό προσωπικό.

Στα πιο συχνά εμφανιζόμενα πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια σήμερα συγκαταλλέγονται η *K. pneumoniae* και η *P. aeruginosa*. Η παραγωγή β-λακταμασών αποτελεί το σημαντικότερο μηχανισμό αντοχής των εντεροβακτηριοειδών και της *P. aeruginosa* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Στην Ελλάδα η αντοχή της *K. pneumoniae* στις καρβαπενέμες οφείλεται στην παρουσία δύο κυρίως καρβαπενεμασών, του μεταλλοενζύμου VIM, και του ενζύμου KPC. Αντίστοιχα η αντοχή της *P. aeruginosa* στις καρβαπενέμες σχετίζεται η παραγωγή του μεταλλοενζύμου VIM.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία μελέτη των μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* σε χρονικό διάστημα έξι διαδοχικών μηνών του έτους 2014 στο ΠΓΝ Λάρισας. Αξίζει να αναφέρουμε ότι για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ο συνολικός αριθμός στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν στο ΠΓΝ Λάρισας ήταν 244 και από αυτά το 60% εμφάνισαν αντοχή στις καρβαπενέμες. Αντίστοιχα, στο ίδιο χρονικό διάστημα απομονώθηκαν συνολικά 229 στελέχη *P. aeruginosa* εκ των οποίων αντοχή στις καρβαπενέμες εμφάνισε το 38%.

Οι περισσότερες λοιμώξεις από τα εν λόγω στελέχη (που αφορούν την παρούσα μελέτη) καταγράφηκαν στις κλινικές του παθολογικού τομέα (53,2%) και ακολούθησαν οι Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) (32,1%) και τέλος του χειρουργικού τομέα (14,6%).

Αναφορικά με το είδος της λοίμωξης που καταγράφηκε, οι ουρολοιμώξεις και οι πνευμονίες ήταν οι συχνότερες και ανέρχονταν σε ποσοστά 32,1% και 21,1% αντίστοιχα, ενώ ακολουθούσαν οι μικροβιαμίες (19,2%).

Μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* που μελετήθηκαν, η παραγωγή KPC καταγράφηκε ως ο συνηθέστερος μηχανισμός αντοχής (82%), ενώ ο συνδυασμός KPC και VIM καταγράφηκε σε ποσοστό 7%. Σε ένα μόνο μικρό ποσοστό που αγγίζει το 3% δεν παρατηρήθηκε παραγωγή β-λακταμάσης είτε τύπου KPC είτε τύπου VIM, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων στελεχών οφείλεται σε έναν από τους λιγότερα συχνούς μηχανισμούς αντοχής όπως, την απώλεια πορινών με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης, τα συστήματα αντλιών αποβολής του αντιβιοτικού ή τη τροποποίηση στόχου δράσης-PBPs

Σε ποσοστό 44% στελεχών *P. aeruginosa* η αντοχή στις καρβαπενέμες συσχετίστηκε με την παραγωγή VIM. Αντιθέτως σε ποσοστό 56% δεν ανευρέθηκε το μεταλλοένζυμο VIM γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα των στελεχών αυτών οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς αντοχής του βακτηρίου, όπως η υπερπαραγωγή της χρωμοσωμιακής AmpC β-λακταμάσης, η απώλεια ή μειωμένη έκφραση πορίνης OprD της εξωτερικής μεμβράνης και η υπερέκφραση ενεργού αντλίας εκροής του φαρμάκου (MexAB-OprM).

Στα στελέχη *K. pneumoniae*, η αντοχή στις καρβαπενέμες συνδυάζεται όπως προκύπτει από το αντιβιογράμμά τους με παράλληλη αντοχή στα υπόλοιπα β-λακταμικά

αντιβιοτικά (>95%), στις αμινογλυκοσίδες (70,1%) (εξαίρεση η γενταμικίνη που εμφανίζει συγκριτικά πολύ μικρότερο ποσοστό αντοχής της τάξης του 10,5%), στις κινολόνες (91,2%) και στην κοτριμοξαζόλη (78,9%). Θεραπευτική επιλογή παραμένει η κολιστίνη, η γενταμικίνη και η τετρακυκλίνη. Στα στελέχη *P. aeruginosa* αντίστοιχα, η αντοχή στις καρβαπενέμες συνδυάζεται επίσης με υψηλά ποσοστά αντοχής στα υπόλοιπα β-λακταμικά αντιβιοτικά (>55%), στις αμινογλυκοσίδες (63,4%) και στις κινολόνες (73%) με κύριο όπλο στη θεραπευτική φάρετρα να παραμένει η κολιστίνη.

Παρακάτω παρατίθενται συγκεντρωτικοί πίνακες που αναδεικνύουν το προφίλ αντοχής ανθεκτικών σε καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* (εικ. 22) και *P. aeruginosa* (εικ. 23) στον Ελλαδικό χώρο το έτος 2010. Τα ποσοστά αντοχής στους συγκεκριμένους ανιμικροβιακούς παράγοντες είναι ανάλογα με αυτά που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

Antibiotic name	% Resistance		
	MED	SUR	ICU
Amikacin	67,1	56,4	53,7
Gentamicin	22,4	16,4	26,2
Netilmicin	97,2	95,6	91,5
Tobramycin	91,3	91,1	86,5
Ciprofloxacin	98,0	96,4	96,6
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	91,3	96,4	88,3

*MED* = παθολογικές κλινικές, *SUR* = χειρουργικές κλινικές, *ICU* = μονάδες εντατικής θεραπείας

**Εικόνα 22:** Προφίλ αντοχής στελεχών *K. pneumoniae* ανθεκτικών σε καρβαπενέμες (ελληνικό δίκτυο μελέτης της μικροβιακής αντοχής 2010).

Antibiotic name	% Resistance		
	MED	SUR	ICU
Amikacin	67,1	64,7	56,3
Gentamicin	48,6	41,2	61,7
Netilmicin	50,0	61,5	64,2
Tobramycin	71,0	64,7	69,4
Ciprofloxacin	75,7	82,4	71,1

*MED* = παθολογικές κλινικές, *SUR* = χειρουργικές κλινικές, *ICU* = μονάδες εντατικής θεραπείας

**Εικόνα 23:** Προφίλ αντοχής στελεχών *P. aeruginosa* ανθεκτικών σε καρβαπενέμες (ελληνικό δίκτυο μελέτης της μικροβιακής αντοχής 2010).

Παράλληλα, στα συγκεκριμένα στελέχη εφαρμόστηκαν φαινοτυπικές δοκιμασίες ανίχνευσης καρβαπενεμασών με χρήση ειδικών αναστολέων, με εξαιρετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, για τα στελέχη της *K. pneumoniae* η φαινοτυπική δοκιμασία με χρήση PBA/EDTA εξήγαγε όμοια συμπεράσματα για την παραγωγή ή μη καρβαπενεμασών σε σχέση με τη χρήση μοριακών τεχνικών ανίχνευσης (PCR) σε ποσοστό 96,5%. Η

ευαισθησία της τεχνικής αγγίζει το 100%. Ομοίως, για τα στελέχη της *P. aeruginosa* οι δύο μέθοδοι εμφανίζονται ταυτόσημες σε ποσοστό 77% με το ίδιο ποσοστό ευαισθησίας.

Επειδή η μοριακή ανίχνευση των β-λακταμασών είναι πρακτικά δύσκολη, στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται στα εργαστήρια γρήγορες φαινοτυπικές δοκιμασίες για τη διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής σε καρβαπενέμες σε ανθεκτικά στελέχη με στόχο τον περιορισμό της διασποράς τους. Συνεπώς, η συμβολή του μικροβιολογικού εργαστηρίου στη γρήγορη ανίχνευση των πολυανθεκτικών στελεχών είναι σημαντική.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, and Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions (submitted for publication).
2. Vatopoulos A. High rates of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece-a review of the current evidence. *Eurosurveillance* 2008; 13(4): pii=8023
3. Woese R.C. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 52(2):221-27, 1987
4. Prescott L, Harley J, Klein D. "Microbiology", 6th ed., McGraw-Hill, USA, 2005, ISBN:0072556781
5. Ελένη Γιαμαρέλλου και συνεργάτες 2009. Λοιμώξεις και αντιμικροβιακή θεραπεία. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
6. Lu P.L, Liu Y.C, Toh H.S, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific re-gion: 2009–2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int. J. Antimicrobial Agents*, 40:S37-S43, 06, 2012
7. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι., 1999 Ιατρική Μικροβιολογία. Τόμος ΙΙ . Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
8. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:589.
9. Pollack M, Charache P, Nieman RE, et al. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet* 1972; 2:668.
10. Asensio A, Oliver A, González-Diego P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000; 30:55.
11. Selden R, Lee S, Wang WL, et al. Nosocomial *klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med* 1971; 74:657.
12. Akoachere JF, Bughe RN, Oben BO, et al. Phenotypic characterization of human pathogenic bacteria in fish from the coastal waters of South West Cameroon: public health implications. *Rev Environ Health* 2009; 24:147.
13. Jang S, Wheeler L, Carey RB, et al. Pleuritis and suppurative pneumonia associated with a hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol* 2010; 141:174.

14. Castinel A, Grinberg A, Pattison R, et al. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from New Zealand sea lion (*Phocarctos hookeri*) pups during and after the epidemics on Enderby Island, Auckland Islands. *Vet Microbiol* 2007; 122:178.
15. Anderson DJ, Richet H, Chen LF, et al. Seasonal variation in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection on 4 continents. *J Infect Dis* 2008; 197:752.
16. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:160.
17. Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med* 2002; 162:1021.
18. Kang CI, Kim SH, Bang JW, et al. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci* 2006; 21:816.
19. Lee KH, Hui KP, Tan WC, Lim TK. *Klebsiella* bacteraemia: a report of 101 cases from National University Hospital, Singapore. *J Hosp Infect* 1994; 27:299.
20. Feldman C, Smith C, Levy H, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia at an urban general hospital. *J Infect* 1990; 20:21.
21. Lu CH, Chang WN, Wu HS. *Klebsiella pneumoniae* meningitis: analysis on clinical features of thirty-two adult patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1997; 60:296.
22. Watanakunakorn C, Jura J. *Klebsiella* bacteremia: a review of 196 episodes during a decade (1980-1989). *Scand J Infect Dis* 1991; 23:399.
23. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect* 1998; 38:119.
24. Haddy RI, Lee M 3rd, Sangal SP, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in the community hospital. *J Fam Pract* 1989; 28:686.
25. Lin SH, Kuo PH, Hsueh PR, et al. Sputum bacteriology in hospitalized patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in Taiwan with an emphasis on *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Respirology* 2007; 12:81.
26. Yi ZM, Yang H, Xiang XD. [Characteristics of bacteriology and drug sensitivity in patients with COPD combined with pneumonia]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2003; 28:272.



27. Yang PY, Huang CC, Leu HS, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: community-acquired vs. nosocomial infections. *Chang Gung Med J* 2001; 24:688.
28. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91:72S.
29. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11(4):589-603, 1998)
30. Cryz SJ Jr, Mortimer PM, Mansfield V, Germanier R. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 1986; 23:687.
31. Fung CP, Hu BS, Chang FY, et al. A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: high prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. *J Infect Dis* 2000; 181:2075.
32. Fung CP, Chang FY, Lee SC, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut* 2002; 50:420.
33. Yeh KM, Kurup A, Siu LK, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol* 2007; 45:466.
34. Fang CT, Lai SY, Yi WC, et al. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clin Infect Dis* 2007; 45:284.
35. Chung DR, Lee SS, Lee HR, et al. Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Infect* 2007; 54:578.
36. Jenney AW, Clements A, Farn JL, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in an Australian Tertiary Hospital and its implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2006; 44:102.
37. Blanchette EA, Rubin SJ. Seroepidemiology of clinical isolates of *Klebsiella* in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1980; 11:474.
38. Mizuta K, Ohta M, Mori M, et al. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun* 1983; 40:56.
39. Athamna A, Ofek I, Keisari Y, et al. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1991; 59:1673.
40. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:239.

41. Kabha K, Nissimov L, Athamna A, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 1995; 63:847.
42. Lin JC, Chang FY, Fung CP, et al. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect* 2004; 6:1191.
43. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:20.
44. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun* 2002; 70:2583.
45. Kawai T. Hypermucoviscosity: an extremely sticky phenotype of *Klebsiella pneumoniae* associated with emerging destructive tissue abscess syndrome. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1359.
46. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med* 2004; 199:697.
47. Alvarez D, Merino S, Tomás JM, et al. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect Immun* 2000; 68:953.
48. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 2006; 42:1351.
49. Amako K, Meno Y, Takade A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* 1988; 170:4960.
50. Nassif X, Honoré N, Vasselon T, et al. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1989; 3:1349.
51. Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, et al. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2). *Infect Immun* 1991; 59:2043.
52. Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun* 1989; 57:546.

53. Wacharotayankun R, Arakawa Y, Ohta M, et al. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by RmpA2, which shows homology to NtrC and FixJ. *Infect Immun* 1993; 61:3164.
54. Lai YC, Peng HL, Chang HY. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol* 2003; 185:788.
55. Ma LC, Fang CT, Lee CZ, et al. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J Infect Dis* 2005; 192:117.
56. Tomás JM, Benedí VJ, Ciurana B, Jofre J. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect Immun* 1986; 54:85
57. McCallum KL, Laakso DH, Whitfield C. Use of a bacteriophage-encoded glycanase enzyme in the generation of lipopolysaccharide O side chain deficient mutants of *Escherichia coli* O9:K30 and *Klebsiella* O1:K20: role of O and K antigens in resistance to complement-mediated serum killing. *Can J Microbiol* 1989; 35:994.
58. Albertí S, Marqués G, Camprubí S, et al. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect Immun* 1993; 61:852.
59. Albertí S, Alvarez D, Merino S, et al. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 1996; 64:4726.
60. Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, et al. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect Immun* 2004; 72:1423.
61. Miles AA, Khimji PL. Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection, and relation to pathogenicity. *J Med Microbiol* 1975; 8:477.
62. Lodge JM, Williams P, Brown MR. Influence of growth rate and iron limitation on the expression of outer membrane proteins and enterobactin by *Klebsiella pneumoniae* grown in continuous culture. *J Bacteriol* 1986; 165:353.
63. Nassif X, Sansonetti PJ. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* 1986; 54:603.
64. Williams P, Smith MA, Stevenson P, et al. Novel aerobactin receptor in *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 1989; 135:3173.

65. Podschun R, Sievers D, Fischer A, Ullmann U. Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections. *J Infect Dis* 1993; 168:1415.
66. Podschun R, Fischer A, Ullmann U. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralbl Bakteriol* 1992; 276:481.
67. Tarkkanen AM, Allen BL, Williams PH, et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of *Klebsiella* strains associated with human urinary tract infection. *Infect Immun* 1992; 60:1187.
68. Vernet V, Philippon A, Madoulet C, et al. Virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 130:51.
69. Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun* 1998; 66:2887.
70. Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 2003; 149:2397.
71. Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun* 2001; 69:5805.
72. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, et al. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* 1996; 64:2266.
73. Vernet V, Madoulet C, Chippaux C, Philippon A. Incidence of two virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) among 190 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 75:1.
74. Lin TL, Tang SI, Fang CT, et al. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* strains in Taiwan: recharacterization of shv-27, shv-41, and tem-116. *Microb Drug Resist* 2006; 12:12.
75. Chan KS, Yu WL, Tsai CL, et al. Pyogenic liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae*: analysis of the clinical characteristics and outcomes of 84 patients. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120:136.
76. Sahly H, Aucken H, Benedí VJ, et al. Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3477.
77. Βατόπουλος Α. Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά :Ένα σημαντικό άγνωστο πρόβλημα της δημόσιας υγείας, *Κοινωνία και Υγεία* , σ.95-107, 2007

78. Walsh C. "Antibiotics: actions, origins, resistance", American Society for Microbiology, Washington, 2003, ISBN:1-55581-254-6
79. Geisla M, Soares S, et al., Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J. Appl. Oral Sci.*, 20(3): 295–304, 2012
80. Velkov T, Roberts D.K. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.*, 8(6): 10.2217, 2013
81. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, et al., Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.*, 9;4:353, 2013
82. Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου, 1999 Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία. Τόμος Α' . Ιατρικές Εκδοτικός οίκος «παρατηρητής».
83. Gootz T.D. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(1): 13–31, 1990
84. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι., 1999 Ιατρική Μικροβιολογία. Τόμος Ι. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
85. Κοτζιά Δ, Μεταξά Ζ, Σπηλιοπούλου Ι. Μικροβιακή αντοχή : ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. *Bio Health*, Νο6, Απρίλιος 2013
86. Gootz T.D. The global problem of antibiotic resistance. *Crit. Rev. Immunol.*, 30(1):79-93, 2010
87. Frost L.S, Koraimann G. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.*, 5(7):1057-71, 2010
88. Smillie C, Garcillán-Barcia M.P. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3):434-52, 2010
89. Hall R.M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1267:71-8, 2012
90. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*, 14:224;2-8, 2010
91. Bush K, Jacoby A.G. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(3):969-976, 2010
92. Page M.I. The Reactivity of  $\beta$ -Lactams, the Mechanism of Catalysis and the Inhibition of  $\beta$ -Lactamases. *Current Pharmaceutical Desing*, 5:895-913, 1999
93. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 16;289(1036):321-31, 1980
94. Paterson L.D, Bonomo A.R. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4):657-686, 2005

95. Naas T, Vandell L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994, 38:1262-1270.
96. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC et al. SME-type carbapenemhydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:3035-3039.
97. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:2080-2086.
98. Pottumarthy S, Moland ES, Jeretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003, 9:999-1002.
99. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech- Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenemresistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47:3881-9.
100. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011, May 4. [Epub ahead of print].
101. Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66:1184-1186.
102. Tzouvelekis L.S, Bonomo R.A. SHV-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des.*, 5(11):847-64, 1999
103. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:2247-53.
104. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:622-32.

105. Cricco J.A, Vila A.J. Class B beta-lactamases: the importance of being metallic. *Curr. Pharm. Des.*, 5(11):915-27, 1999
106. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003, 41:5407-13.
107. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:1229-35.
108. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. & Nordmann, P. (2005). Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18, 306–325.
109. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:1584-90.
110. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis* 2000, 6:84-85.
111. Petropoulou D, Tzanetou K, Syriopoulou VP, Daikos GL, Ganteris G, Malamou-Lada E. Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. *Microb Drug Resist* 2006, 12:39
112. Loli A, Tzouveleki LS, Gianneli D, Tzelepi E, Miriagou V. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* with chromosomally encoded VIM-1 undetectable by imipenem-EDTA synergy tests. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52:1894-1896
113. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1290-1292.
114. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouveleki LS, Tsakris A, Legakis NJ, et al. Hospital outbreak of multiple multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1409-1414.
115. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the

- UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010, 10:597-602.
116. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:5046-5054.
  117. Suh B, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Lee K. Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:5057-5061.
  118. Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Hoiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:3406-3411.
  119. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:882-889.
  120. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des.*, 5(11):865-79, 1999
  121. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993, 2:81-7.
  122. Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol* 2002, 40:4741-4743.
  123. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006, 57:557-61.
  124. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Emerging spread of OXA-48-encoding plasmid from Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54:1369-1373.



125. Pagès J.M, James C.E, Winterholter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(12):893-903,2008
126. Hernandez-Alles S, Albert S, Alvarez D, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 145:673-679, 1999
127. Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, et al. Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein and Peptide Science*, 13:843-854, 2012
128. Doumith M, Ellington J.M, Livermore M.D, et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:659– 667, 2009
129. Doménech-Sánchez A, Hernández-Allés S, Martínez-Martínez L, et al., Identification and Characterization of a New Porin Gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its Role in  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.*, p. 2726–2732, 1999
130. Martínez-Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, et al., Roles of  $\beta$ -Lactamases and Porins in Activities of Carbapenems and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(7):1669, 1999
131. Satake S, Yoneyama H, Nakae T. Role of OmpD2 and chromosomal  $\beta$ -lactamase in carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1991, 28:199-207.
132. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:4783-4788.
133. Webber A.M, Piddock VJ.L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:9–11, 2003
134. Anderson K. Efflux Pumps in Multidrug Resistant Bacteria. *Bioinformatics and Bioengineering Summer Institute*, Virginia Commonwealth University, 2010 109
135. Poole K, Heinrichs DE, Neshat S. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* 1993, 10:529-544.
136. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002, 34:634-640.
137. Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, et al. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1996, 21:713-724.

138. Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997, 23:345-354.
139. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2003, 2:48-62.
140. Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Euro Surveill.*, 14(21), 2009
141. Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1151-1161.
142. Miriagou, V., L. S. Tzouvelekis, S. Rossiter, E. Tzelepi, F. J. Angulo, and J. M. Whichard. 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1297-1300.
143. Moland, E. S., N. D. Hanson, V. L. Herrera, J. A. Black, T. J. Lockhart, A. Hossain, J. A. Johnson, R. V. Goering, and K. S. Thomson. 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:711-714.
144. Bratu, S., D. Landman, M. Alam, E. Tolentino, and J. Quale. 2005. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:776-778.
145. Meyer, K. S., C. Urban, J. A. Eagan, B. J. Berger, and J. J. Rahal. 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann. Intern. Med.* 119:353-358.
146. Quale, J. M., D. Landman, P. A. Bradford, M. Visalli, J. Ravishankar, C. Flores, D. Mayorga, K. Vangala, and A. Adedeji. 2002. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin. Infect. Dis.* 35:834-841.
147. Woodford, N., P. M. Tierno, Jr., K. Young, L. Tysall, M.-F. I. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, and D. M. Livermore. 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4793-4799.

148. Alba, J., Y. Ishii, K. Thomson, S. Moland Ellen, and K. Yamaguchi. 2005. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4760-4762.
149. Naas, T., P. Nordmann, G. Vedel, and C. Poyart. 2005. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4423-4424.
150. Villegas, M. V., K. Lolans, O. M. del Rosario, C. J. Suarez, A. Correa, A. M. Queenan, and J. P. Quinn. 2006. First detection of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:226-229.
151. Navon-Venezia, S., I. Chmelnitsky, A. Leavitt, M. J. Schwaber, D. Schwartz, and Y. Carmeli. 2006. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3098-3101.
152. Wei, Z.-Q., X.-X. Du, Y.-S. Yu, P. Shen, Y.-G. Chen, and L.-J. Li. 2007. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:763-765.
153. Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1257-60.
154. Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin. Infect. Dis.*, 50(3):364-73, 2010
155. Lynch P.J, Clark M.N, Zhanel G.G. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(2):199-210, 2013 110
156. L, Riccio M, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini G M. 2001. "In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (4): 1249-53. doi:10.1128/AAC.45.4.1249-1253.2001.
157. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4051-5.

158. P. Giakkoupi, A. Xanthaki, M. Kanelopoulou, A. Vlahaki, V. Miriagou, S. Kontou, E. Papafraggas, H. Malamou-Lada, L. S. Tzouvelekis, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos. VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003 Aug; 41(8): 3893–3896.
159. Scoulica, E. V., I. K. Neonakis, A. I. Gikas, and Y. J. Tselentis. 2004. Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:167-172.
160. Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D. & Nordmann, P. (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenemhydrolyzing metallo-b-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 891–897.
161. Poirel, L., Lambert, T., Turkoglu, S., Ronco, E., Gaillard, J. & Nordmann, P. (2001b). Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing b-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 546–552.
162. Lagatolla, C., E. A. Tonin, C. Monti-Bragadin, L. Dolzani, F. Gombac, C. Bearzi, E. Edalucci, F. Gionechetti, and G. M. Rossolini. 2004. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 10:535-538.
163. Yan, J.-J., W.-C. Ko, C.-L. Chuang, and J.-J. Wu. 2002. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:503-511.
164. Yum, J. H., D. Yong, K. Lee, H.-S. Kim, and Y. Chong. 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42:217-219.
165. Jeong, S. H., K. Lee, Y. Chong, J. H. Yum, S. H. Lee, H. J. Choi, J. M. Kim, K. H. Park, B. H. Han, S. W. Lee, and T. S. Jeong. 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:397-400.
166. Yan, J. J., P. R. Hsueh, W. C. Ko, K. T. Luh, S. H. Tsai, H. M. Wu, and J. J. Wu. 2001. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2224-2228.

167. Pournaras, S., A. Tsakris, M. Maniati, L. S. Tzouveleakis, and A. N. Maniatis. 2002. Novel variant (blaVIM-4) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:4026-4028.
168. Giske, C. G., M. Rylander, and G. Kronvall. 2003. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3034-3035.
169. Francesco Luzzaro, Jean-Denis Docquier, Céline Colinon, Andrea Endimiani, Gianluigi Lombardi, Gianfranco Amicosante, Gian Maria Rossolini, and Antonio Toniolo Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*. *Clinical Isolates of the VIM-4 Metallo- $\beta$ -Lactamase Encoded by a Conjugative Plasmid* *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb; 48(2): 648–650.
170. Gül Bahar, Annarita Mazzariol, Raffaella Koncan, Ali Mert, Roberta Fontana, Gian Maria Rossolini and Giuseppe Cornaglia. Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *Antimicrob Chemoth.* 2004 54: 282-283.
171. Koh, T. H., G. C. Wang, and L. H. Sng. 2004. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2334-2336.
172. Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2004. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:329-332.
173. Mendes, R. E., Castanheira, M., Garcia, P., Guzman, M., Toleman, M. A., Walsh, T. R. & Jones, R. N., SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2004b). First isolation of blaVIM-2 in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1433–1434.
174. Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009;47:362-7.
175. Franklin C, Liolios L, Peleg Y. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 3139-44.
176. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- $\beta$ -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1664-71
177. Bartlett M.S.J, Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226:3-6, 2003

178. Strachan T, Read A.P. "Human Molecular Genetics", 4th ed., Garland Science, New York, 2010, ISBN:9780815341499