



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επιδημιολογική μελέτη στελεχών *Klebsiella pneumoniae*  
με αντοχή στις καρβαπενέμες»**

**ΓΚΟΥΝΤΕΛΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ του ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ**

**Ιατρός Βιοπαθολόγος - Μικροβιολόγος**



Λάρισα, Φεβρουάριος 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επιδημιολογική μελέτη στελεχών *Klebsiella pneumoniae*  
με αντοχή στις καρβαπενέμες»**

**ΓΚΟΥΝΤΕΛΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ του ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ**

**Ιατρός Βιοπαθολόγος - Μικροβιολόγος**

**Η τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

- Πτεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας - Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
- Παπαγιαννίτσης Κωνσταντίνος, Επίκουρος καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, Φεβρουάριος 2023



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCE**  
**FACULTY OF MEDICINE**

**MASTER PROGRAM IN**  
**«CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE»**

**MASTER THESIS**

**“An epidemiological study of carbapenem-resistant  
*Klebsiella pneumoniae* strains”**

**GKOUNTELA CHRISTINA**

**Medical Doctor - Clinical Microbiologist**

**Three-member examing commitee:**

- Petinaki Efthymia, Professor of Medical Biopathology and Clinical Microbiology, Supervising Professor
- Papagiannitsis Konstantinos, Assistant Professor of Medical Microbiology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine

Larisa, February 2023

## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b> .....	<b>6</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>16</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ <i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	<b>19</b>
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ .....	19
1.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ.....	20
1.2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ.....	21
1.2.2 ΕΛΥΤΡΟ .....	22
1.2.3 ΜΑΣΤΙΓΙΑ.....	23
1.2.4 ΚΡΟΣΣΟΙ.....	23
1.3 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ <i>Enterobacteriaceae</i> .....	23
<b>2. <i>Klebsiella</i> spp.</b> .....	<b>24</b>
2.1 <i>Klebsiella</i> spp - ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ .....	24
2.2 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ <i>Klebsiella</i> spp.....	25
2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ <i>K. pneumoniae</i> .....	26
2.3.1 ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΚΑΨΑΣ (Capsular Antigen) .....	27
2.3.2 ΙΝΙΔΙΑ (Fimbriae).....	29
2.3.3 ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ.....	29
2.3.4 ΣΙΔΗΡΟΦΟΡΑ (Siderophores).....	31
2.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ <i>K. pneumoniae</i> .....	32
<b>3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ</b> .....	<b>34</b>
3.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ (OMPs) .....	34
3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ .....	35
<b>4. β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ</b> .....	<b>35</b>
4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ .....	36
4.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ.....	36
<b>5. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ</b> .....	<b>39</b>
5.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ.....	39
5.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ -ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	40
5.3 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Α .....	41
5.3.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Α .....	42
5.3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Α.....	42
5.4 ΜΕΤΑΛΛΟ-β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Β (MBL).....	43
5.4.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Β .....	43
5.4.2 ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Β.....	44

5.5 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ D.....	46
5.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ (CRE).....	47
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>52</b>
<b>1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....</b>	<b>53</b>
<b>2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....</b>	<b>53</b>
<b>3. ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM.....</b>	<b>53</b>
<b>4. ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ Vitek-2.....</b>	<b>54</b>
<b>5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA EXTRACTION).....</b>	<b>55</b>
<b>6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR) .....</b>	<b>57</b>
<b>7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) ..</b>	<b>65</b>
<b>8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....</b>	<b>67</b>
<b>9. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....</b>	<b>69</b>
<b>10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ MLST (Sequencing).....</b>	<b>70</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>72</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>76</b>
<b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>90</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>91</b>

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας στο τμήμα Μοριακής Μικροβιολογίας.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη της κυρίας Ευθυμίας Πετεινάκη, Καθηγήτριας Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, την οποία και ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις υποδείξεις και διορθώσεις της σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Την ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, το χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη συμπαράστασή της όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς τη βοήθειά της η εκπόνηση αυτής της εργασίας δε θα ήταν δυνατή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή, κύριο Παπαγιαννίτη Κωνσταντίνο και τις βιοχημικούς του εργαστηρίου κυρία Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα και κυρία Φλώρου Ζωή για την πολύτιμη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στον εργαστηριακό χώρο και για την άριστη συνεργασία μας.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο

Διεύθυνση

Τηλέφωνο

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο

Υπηκοότητα

Ημερομηνία γέννησης

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Ημερομηνίες (από – έως)
- Επωνυμία και διεύθυνση του εργοδότη
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες

**ΓΚΟΥΝΤΕΛΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

**ΚΙΝΗΤΟ:**

### **Αφαίρεση προσωπικών δεδομένων** (Υπηρεσία Βιβλιοθήκης & Πληροφόρησης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας)

Από 12/06/2018 έως σήμερα

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Επικουρική Ιατρός ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας

Ειδική ιατρός στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, στο τμήμα των καλλιιεργειών, στο τμήμα των μυκοβακτηριδίων και στο ιολογικό εργαστήριο.

Η θέση που κατέχω περιλαμβάνει τις εξής αρμοδιότητες:

-Ερμηνεία των αντιβιογραμμάτων των μικροβίων που απομονώνονται από τις καλλιέργειες.

-Αξιολόγηση των καλλιιεργημάτων κλινικών δειγμάτων όπως αιμάτων, πύων, ιστών, καθετήρων, βρογχικών εκκρίσεων, πτυέλων, ωτικών και οφθαλμικών επιχρισμάτων, υγρών (εγκεφαλονωτιαία, ασκίτικα, πλευριτικά, αρθρικά, περικαρδιακά), κολπικών εκκριμάτων, κοπράνων και ούρων.

-Έκδοση των αποτελεσμάτων της αξιολόγησης.

-Μικροσκοπική εξέταση υγρών και δειγμάτων ούρων.

-Μικροσκοπική εξέταση χρώσης Ziehl-Neelsen και αξιολόγηση καλλιιεργειών για μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης και άτυπα μυκοβακτηρίδια σε στερεά (Lowenstein-Jensen) και υγρά (MGIT) θρεπτικά υλικά.

-Εκτέλεση όλων των εξετάσεων του ιολογικού εργαστηρίου. Εξετάσεις για ανίχνευση ιών ηπατίτιδας, HIV και άλλων ιών. Ορολογικός έλεγχος για τη σύφιλη. Εκτέλεση οροαντίδρασης Rose Bengal και Wright-coombs για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Γνώση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

- Ημερομηνίες (από – έως)
- Επωνυμία και διεύθυνση του εργοδότη
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες

-Εκτέλεση όλων των εξετάσεων των εργαστηρίων.  
 -Έκδοση των αποτελεσμάτων των εξετάσεων και επικοινωνία με τα ανάλογα τμήματα / κλινικές του νοσοκομείου. Κατά περίπτωση, περαιτέρω συζήτηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τους υπεύθυνους κλινικούς ιατρούς με βάση την υποκείμενη κλινική εικόνα.  
 -Συμμετοχή στο πρόγραμμα εφημεριών των εργαστηρίων μικροβιολογίας και βιοχημείας.  
 -Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα του εργαστηρίου με παρουσιάσεις και βιβλιογραφικές ενημερώσεις.  
 -Εκπαίδευση ειδικευόμενων ιατρών Ιατρικής Βιοπαθολογίας.  
 -Επίβλεψη ειδικευόμενων ιατρών Ιατρικής Βιοπαθολογίας ως ειδική ιατρός κατά την εφημέρευση του νοσοκομείου.

Από 22/01/2014 έως 22/01/2018

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Ειδικευόμενη Ιατρός

Συνέχιση και ολοκλήρωση της άσκησης στην ειδικότητα της Ιατρικής Βιοπαθολογίας για τέσσερα χρόνια. Υπηρέτησα 9 μήνες στο εργαστήριο Αιμοδοσίας – Αιματολογικό, 15 μήνες στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, 6 μήνες στο Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας, 6 μήνες στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας και 12 μήνες στην Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Συμμετοχή στο πρόγραμμα 24ωρων εφημεριών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας ως ειδικευόμενη ιατρός Ιατρικής Βιοπαθολογίας.

- Ημερομηνίες (από – έως)
- Επωνυμία και διεύθυνση του εργοδότη
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες

Από 15/11/2011 έως 30/12/2012

Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων

Ειδικευόμενη Ιατρός

Έναρξη της άσκησης στην ειδικότητα της Ιατρικής Βιοπαθολογίας κατά τη διάρκεια της οποίας παρακολούθησα 3 μήνες στην Μικροβιολογία, 6 μήνες εκπαίδευση σε Βιοχημικό αναλυτή και 3 μήνες εκπαίδευση σε Αιματολογικό αναλυτή και αναλυτή Αιμόστασης, από 15/11/2011 έως 14/11/2012.

Παράταση της άσκησης στο Εργαστήριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας από 15/11/2012 έως 30/12/2012.

Συμμετοχή στο πρόγραμμα 24ωρων εφημεριών του Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων ως ειδικευόμενη ιατρός Ιατρικής Βιοπαθολογίας.



- Ημερομηνίες (από – έως)
- Επωνυμία και διεύθυνση του εργοδότη
- Απασχόληση ή θέση που κατείχατε
- Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες

#### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ**

- Επίπεδο κατάρτισης με βάση την εθνική ταξινόμηση

• 2003

- Διάρκεια σπουδών
- Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση
- Τίτλος
- Επίπεδο κατάρτισης με βάση την εθνική ταξινόμηση

#### **ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ**

**ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ**  
 ΜΗΤΡΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ  
 Άλλες Γλώσσες  
 Αγγλικά  
 Γαλλικά

Από 17/11/2010 έως 16/07/2011

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΠΕΡΙΘΑΛΨΗΣ ΑΣΦΑΛΙΣΜΕΝΩΝ ΔΗΜΟΣΙΟΥ (Ο.Π.Α.Δ)

Ελεγκτής Ιατρός

Ιατρός με αρμοδιότητα την έγκριση των εξετάσεων που συνταγογραφούνται από τους ιατρούς στους ασφαλισμένους του Δημοσίου εφόσον τις χορηγεί το ταμείο του Δημοσίου και δύναται να τις αποζημιώσει.

Ανώτατο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΕΙ) –Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

➤ Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με Πανελλήνιες εξετάσεις και σειρά εισαγωγής 2<sup>η</sup>.

➤ Αποφοίτηση από το 2<sup>ο</sup> Ενιαίο Λύκειο Λάρισας με βαθμό «Άριστα».

2003-2009

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ,  
 ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ,  
 ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
 Πτυχίο Ιατρικής (25/09/2009)

Ανώτατο Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΑΕΙ) –Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Υποτροφία από το Ίδρυμα Δεληγιώργη (2006)

Ελληνικά

Cambridge First Certificate (1999)

D.E.L.F. 1er Degre (2002)

**ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ  
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ (Η/Υ)**

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ  
ΣΥΝΕΔΡΙΑ –  
ΣΥΜΠΟΣΙΑ – ΜΑΘΗΜΑΤΑ**

- Χειρισμός προγραμμάτων αυτοματισμού γραφείου: **επεξεργασίας κειμένου** (Microsoft Word), **λογιστικών φύλλων υπολογισμού** (Microsoft Excel), **δημιουργίας παρουσιάσεων** (Microsoft Power Point).
- Χειρισμός προγραμμάτων **πλοήγησης στο Διαδίκτυο και ηλεκτρονικού ταχυδρομείου**: *Φυλλομετρητές* (Internet Explorer, Mozilla Firefox), *ηλεκτρονικού ταχυδρομείου* (Microsoft Outlook).
- Συμμετοχή στο **6<sup>ο</sup> Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδας**, (Λάρισα, 28 – 30 Νοεμβρίου 2003)
- Συμμετοχή στο **Συμπόσιο «Νέες Εξελίξεις στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (ART)»**, (Λάρισα, 3 – 4 Απριλίου 2004)
- Συμμετοχή στο **10<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας**, (Θεσσαλονίκη, 14 – 16 Μαΐου 2004)
- Συμμετοχή στο **1<sup>ο</sup> Συνέδριο με θέμα: «Κοινωνική Διαχείριση του Θανάτου»**, (Λάρισα, 3 – 4 Δεκεμβρίου 2004)
- Συμμετοχή στο **Διεθνές Συμπόσιο «Σύγχρονες Απόψεις και Εξελίξεις στην Αντιμετώπιση των Παθήσεων του Γόνατος»**, (Λάρισα, 2 – 4 Δεκεμβρίου 2004)
- Συμμετοχή στο **4<sup>ο</sup> Παιδιατρικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας**, (Λάρισα, 27 - 28 Μαρτίου 2004)
- Συμμετοχή στο **Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: «H5N1 – Όλη η αλήθεια για το νέο θανατηφόρο ιό και πώς να τον αντιμετωπίσουμε»**, που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του 12<sup>ου</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας (Λάρισα, 5-7 Μαΐου 2006)
- Συμμετοχή στη **στρογγυλή τράπεζα ουρολογίας με θέμα «Επιδημιολογία, διάγνωση και screening του καρκίνου του προστάτη»**, στο 12<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας (Λάρισα, 5 - 7 Μαΐου 2006)
- Συμμετοχή στο **12<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας**, (Λάρισα, 5 - 7 Μαΐου 2006)
- Συμμετοχή στο **Συμπόσιο «Infertility and Art Update»**, (Λάρισα, 28 - 29 Μαρτίου 2009)
- Συμμετοχή στο **11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικών Λοιμώξεων**, (Ιωάννινα, 20 - 22 Νοεμβρίου 2009)

- Συμμετοχή στην **Ημερίδα με θέμα: «Ζωονόσοι: ένα διαχρονικό πρόβλημα»**, (Λάρισα, 27 Φεβρουαρίου 2016) και **παρουσίαση εργασίας με θέμα: «Άνθρακας»**
- Συμμετοχή σε ελεύθερη ανακοίνωση με θέμα: **«Υψηλή συχνότητα αποικισμού VRE σε ασθενείς χειρουργικού τμήματος τριτοβάθμιου νοσοκομείου»** στο **9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας** (Αθήνα, 2-4 Ιουνίου 2016)
- Συμμετοχή στο **Φθινοπωρινό Σχολείο με θέμα: «Επίχρισμα περιφερικού αίματος και μυελού – Διοίκηση ιδιωτικού Βιοπαθολογικού εργαστηρίου»**, (Καλαμπάκα, 11-13 Νοεμβρίου 2016)
- Συμμετοχή στο **1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαδικτυακό Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας** (11 – 13 Δεκεμβρίου 2020)
- Συμμετοχή στην **21<sup>η</sup> Ετήσια Ημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας με θέμα «Η πανδημία του SARS-CoV-2 και η διάγνωση του παθογόνου»** (20 Φεβρουαρίου 2021)
- Συμμετοχή στο **35<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Διαδικτυακό Σεμινάριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας με θέμα «Ο κεντρικός ρόλος του βιοπαθολόγου στην πανδημία COVID19»** (5-7 Μαρτίου 2021)
- Συμμετοχή στο **10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Ιατρικής Βιοπαθολογίας** (2-4 Απριλίου 2021)
- Συμμετοχή στο **11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας** (Αθήνα, 1-3 Οκτωβρίου 2021)
- Συμμετοχή στην **Επιστημονική Συνάντηση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρίας με θέμα «Επίκαιρα Θέματα Εργαστηριακής Ιατρικής: προσαρμογή στις νέες προκλήσεις»** (15-17 Οκτωβρίου 2021)
- Συμμετοχή στο **9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μυκητολογίας με θέμα «Μυκητικές λοιμώξεις: διαγνωστικές και θεραπευτικές προκλήσεις»** (19-21 Νοεμβρίου 2021)
- Συμμετοχή στο **Ετήσιο Σεμινάριο Ανοσολογίας 2021 με θέμα «Ειδική Ανοσία: Σύγχρονη Προσέγγιση των Κυτταρικών και Μοριακών Μηχανισμών»** (3-5 Δεκεμβρίου 2021)

- Συμμετοχή στο **Πανελλήνιο Συνέδριο για τα 90 χρόνια της Ε.Μ.Ε. με θέμα «Ιατρική Βιοπαθολογία η εμπειρία του παρελθόντος, οι προκλήσεις του μέλλοντος»** (28-30 Ιανουαρίου 2022)
- Συμμετοχή στο **1<sup>ο</sup> Webinar του Ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής, με θέμα «Η συμβολή της Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής στην COVID-19»** (12 Μαρτίου 2022)
- Συμμετοχή στο **36<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Διαδικτυακό Σεμινάριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας** (18-20 Μαρτίου 2022)
- Συμμετοχή στο **Σεμινάριο με θέμα «Εφαρμογή του συστήματος EUCAST στην Ελλάδα»** (18 Μαρτίου 2022)
- Συμμετοχή στο **Συνέδριο «Ημέρες Παθολογίας 2022 - 30<sup>ο</sup> Έτος» με τίτλο «Διλήμματα στην Κλινική Παθολογία»** (Αθήνα, 31 Μαρτίου-2 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στο **9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας / 5<sup>ο</sup> Συμπόσιο Εργαστηριακής Αιματολογίας & Αιμοδοσίας** (Αθήνα, 8-10 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στο **Συνέδριο με τίτλο «Η ανθρωπότητα στην εποχή των ιών»** (Αθήνα, 14-16 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στο **2<sup>ο</sup> Webinar του Ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής, με θέμα «Τα οικονομικά και η πολιτική της υγείας στην Ιατρική Βιοπαθολογία / Εργαστηριακή Ιατρική»** (16 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στη **Διημερίδα με θέμα «Σύγχρονες Μοριακές Εξελίξεις. Νέα φάρμακα-Νέες θεραπείες»** (Αθήνα, 29-30 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στο **Συνέδριο με τίτλο «Αλλάζοντας το θεραπευτικό τοπίο απέναντι στον καρκίνο»** (Αθήνα, 29-30 Απριλίου 2022)
- Συμμετοχή στη **Διαδικτυακή Εκδήλωση με θέμα «Εμβόλια: από την Ευλογία στην COVID-19»** (4 Μαΐου 2022)
- Συμμετοχή στο **Συνέδριο με τίτλο «Εξελίξεις αιχμής στην Παιδονευρολογία»** (Καβάλα, 6-8 Μαΐου 2022)

- Συμμετοχή στο 21<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο με τίτλο «Εξελίξεις στην Ογκολογία» (Πάτρα, 20-21 Μαΐου 2022)
- Συμμετοχή στο 3<sup>ο</sup> Webinar του Ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής, με θέμα «Γενική Αίματος: Ένα πολύτιμο εργαλείο στην καθημερινή διαγνωστική προσέγγιση νοσημάτων» (21 Μαΐου 2022)
- Συμμετοχή στη Διημερίδα με θέμα «Ενσωματώνοντας το μοντέρνο στο κλασσικό. Νεότερες εξελίξεις στη βιολογία και θεραπεία των αιματολογικών νόσων» (Αλεξανδρούπολη, 27-28 Μαΐου 2022)
- Συμμετοχή στο 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Καρκίνου Πνεύμονα Από την Έρευνα στην Κλινική Πράξη (Βουλιαγμένη, 16-18 Ιουνίου 2022)
- Συμμετοχή στο Συνέδριο με τίτλο «Η Μοριακή Ιατρική από το Εργαστήριο στην Πράξη: Προκλήσεις και Ερωτήματα VI» (Αθήνα, 30 Ιουνίου-2 Ιουλίου 2022)
- Συμμετοχή στο 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Εφαρμοσμένης Εργαστηριακής Ιατρικής (Αθήνα, 8-9 Οκτωβρίου 2022)
- Συμμετοχή στο 4<sup>ο</sup> Webinar του Ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής, με θέμα «Τα αυτοαντισώματα στην κλινική πράξη» (22 Οκτωβρίου 2022)
- Συμμετοχή στο 5<sup>ο</sup> Webinar του Ετήσιου Εκπαιδευτικού Προγράμματος της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας / Εργαστηριακής Ιατρικής, με θέμα «Το αντιβιογράμμα στο Νοσοκομειακό και Ιδιωτικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο» (12 Νοεμβρίου 2022)
- Συμμετοχή στο 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαδικτυακό Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας (17 – 18 Δεκεμβρίου 2022)
- Συμμετοχή στο 10<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Μυκητολογίας με θέμα «Διάγνωση και θεραπεία μυκητιάσεων: με το βλέμμα στο μέλλον» (28 Ιανουαρίου 2023)
- Συμμετοχή στο 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Ιατρικής Βιοπαθολογίας (Αθήνα, 2-4 Μαρτίου 2023)

**ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ  
ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- Υψηλή συχνότητα αποικισμού VRE σε ασθενείς χειρουργικού τμήματος τριτοβάθμιου νοσοκομείου.  
Σ. Σάρρου, Ζ. Φλώρου, Ε. Μάλλη, Χ. Γκουντέλα, Χ. Χριστοφορίδης, Α. Διαμαντής, Μ. Ευθυμίου, Κ. Τεπετές, Ε. Πετεινάκη. 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
- In vitro δράση της dalbavancin έναντι επιλεγμένων Gram-θετικών κόκκων στη Θεσσαλία.  
Χ. Γκουντέλα, Σ. Ξύτσας, Κ. Τρικαλινού, Κ. Τσιλιπουνιδάκη, Ε. Πετεινάκη. 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαδικτυακό Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
- Χαρακτηρισμός των NDM-πλασμιδίων σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* στη Θεσσαλία.  
Κ. Τσιλιπουνιδάκη, Ζ. Φλώρου, Χ. Γκουντέλα, Ε. Πετεινάκη. 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Ιατρικής Βιοπαθολογίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Gram-αρνητικά βακτηρίδια και ειδικά τα εντεροβακτηριακά είναι ένας αυξανόμενος αιτιολογικός παράγοντας νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η ανάπτυξη αντοχής στις καρβαπενέμες έχει γίνει ένα αυξανόμενο πρόβλημα στη θεραπεία των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ειδικά οι καρβαπενεμάσες είναι συχνές στα στελέχη των εντεροβακτηριακών. Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση των τύπων καρβαπενεμάσης σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Ελέγχθηκε η ευαισθησία των προϊόντων απομόνωσης στην ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη. Τα γονίδια καρβαπενεμάσης μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης). Σαράντα πέντε στελέχη *K. pneumoniae* συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Μεταξύ των στελεχών με αντοχή στην καρβαπενέμη, 12 ήταν θετικά για το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>*, 12 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>*, 5 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>NDM</sub>*, 7 για το γονίδιο *bla<sub>NDM</sub>*, 8 για τα γονίδια *bla<sub>NDM</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* και 1 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>NDM</sub>*. Σε 6 στελέχη, ένα από κάθε συνδυασμό γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες έγινε μοριακή τυποποίηση για τον χαρακτηρισμό των βακτηριακών κλώνων με τη μέθοδο της πολυτοπικής τυποποίησης αλληλουχίας (MLST). Τα KPC θετικά στελέχη βρέθηκε ότι ανήκουν στον κλώνο ST219, τα KPC και τα VIM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST323, τα KPC και τα NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST512, τα NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST231, τα NDM και τα OXA-48 θετικά ανήκουν στον κλώνο ST11 και τα OXA-48 θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST39.

## ABSTRACT

Gram-negative bacteria especially *Enterobacteriaceae* species have become an increasing etiologic agent of nosocomial infections. The development of resistance to carbapenems have become an increasing problem in the treatment of nosocomial infections. Especially carbapenamases are common for *Enterobacteriaceae* strains. This study was performed to detect the types of carbapenamases in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from various clinical samples in University Hospital of Larisa. Susceptibility of isolates to imipenem, meropenem and ertapenem was tested. Carbapenemase genes were studied using PCR (Polymerase Chain Reaction). Forty five isolates of *K. pneumoniae* were included in the study. Among the isolates with carbapenem resistance, 12 were positive for gene *bla*<sub>KPC</sub>, 12 for genes *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>VIM</sub>, 5 for genes *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub>, 7 for gene *bla*<sub>NDM</sub>, 8 for genes *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> and 1 for gene *bla*<sub>OXA-48</sub>. Multilocus sequence typing (MLST) was used to characterise 6 isolates, one for each combination of carbapenem resistance genes. In detail, KPC-positive, KPC- and VIM-positive, KPC- and NDM-positive, NDM-positive, NDM- and OXA-48-positive and finally, OXA-48-positive isolates were found to belong to the sequence type ST219, ST323, ST512, ST231, ST11 and ST39, respectively.



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (CRKP-Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae*), αποτελούν διεθνώς το πιο κρίσιμο πρόβλημα στον τομέα των λοιμώξεων και μια πραγματική απειλή για τη δημόσια υγεία.(1)

Μετά από περισσότερα από 70 χρόνια εκτεταμένης χρήσης αντιβιοτικών για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών, η αντίσταση στα αντιβιοτικά αναγνωρίζεται πλέον ως παγκόσμια κρίση στη σύγχρονη ιατρική.(2) Η δραματική αύξηση του επιπολασμού των λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά (MDR-Multidrug resistant) και εξαιρετικά ανθεκτικά στα φάρμακα (XDR-Extremely drug resistant) παθογόνα που ανήκουν στην ομάδα των *Enterobacteriaceae* δημιουργεί μεγάλη ανησυχία, καθώς αυτά τα παθογόνα είναι κοινοί φυσικοί κάτοικοι του μικροβιώματος μας. Επιπλέον, λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά τα στελέχη συχνά συνδέονται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, παρατεταμένη νοσηλεία και κόστος.(3)

Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι μια πολυπαραγοντική σύνθετη διαδικασία.(4) Ωστόσο, από την οπτική των βακτηρίων, αντανακλά την εξέλιξη στη δράση, ταυτόχρονα με τη συνεχή έκθεση σε αντιβιοτικά, όπου η επιλεκτική πίεση προκαλεί την εξέλιξη πολλαπλών γενετικών μηχανισμών.(5) Αυτή η συνεχής εξέλιξη με τα χρόνια οδήγησε στην εμφάνιση στελεχών MDR και XDR *Enterobacteriaceae* (6) που παρουσιάζουν αντοχή σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά, χωρίς πιθανές θεραπευτικές επιλογές.(7) Ο κίνδυνος παγκόσμιας διάδοσης αυτών των παθογόνων XDR έχει γίνει αναγνωρισμένη παγκόσμια απειλή.

Στο πλαίσιο της αντοχής στα αντιβιοτικά, ένα «επιτυχές» βακτηριακό στέλεχος θα πρέπει να είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό όχημα για τη διάδοση των χαρακτηριστικών αντοχής στα αντιβιοτικά. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εάν μπορεί να μεταφέρει τα χαρακτηριστικά της αντοχής στα αντιβιοτικά κάθετα στα θυγατρικά του κύτταρα και επίσης εάν μπορεί να λειτουργήσει ως δότης για κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs-Mobile genetic elements), όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια, που μπορούν να μεταφερθούν οριζόντια σε άλλα στελέχη, είδη ή γένη.(8)

Σε αυτή την εποχή της αντοχής στα αντιβιοτικά, η *Klebsiella pneumoniae* αντιπροσωπεύει ένα από τα πιο ανησυχητικά παθογόνα που εμπλέκονται στην αντοχή στα αντιβιοτικά και ως εκ τούτου, μαζί με άλλα πολύ σημαντικά παθογόνα MDR, έχει ταξινομηθεί ως οργανισμός ESKAPE (Gram θετικά *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* και Gram αρνητικά *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*).)(9)

Η κρίση της μικροβιακής αντίστασης (AMR-Antimicrobial Resistance) που αντιμετωπίζουν τα νοσοκομεία παγκοσμίως οφείλεται στα παθογόνα ESKAPE, τα οποία είναι υπεύθυνα για

την πλειοψηφία, λοιμώξεων σε νοσοκομειακούς ασθενείς που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με αντιμικροβιακή θεραπεία.(10) Ιδιαίτερα τα παθογόνα ESKAPE είναι περιβαλλοντικά ή κοινά βακτήρια που προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις σε νοσηλευόμενους ή ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, αλλά γενικά δεν είναι παθογόνα κατά τα άλλα.

Κάθε ένα από αυτά τα είδη έχει ενδογενή αντοχή σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά και μεμονωμένα στελέχη έχουν συσσωρευμένη αντοχή σε πολλά πρόσθετα φάρμακα.(10) Τα Gram αρνητικά παθογόνα ESKAPE θεωρούνται η μεγαλύτερη απειλή, λόγω της εμφάνισης στελεχών που είναι ανθεκτικά σε όλα ή τα περισσότερα διαθέσιμα αντιβιοτικά.(11) Η συσσώρευση της AMR σε αυτούς τους οργανισμούς οφείλεται κυρίως στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT- Horizontal Gene Transfer) που υποβοηθείται από πλασμίδια και κινητά γενετικά στοιχεία.(10) Ο κατάλογος των γνωστών κινητών γονιδίων AMR που υπόκεινται σε HGT μεταξύ των Gram αρνητικών παθογόνων αριθμούνται σε εκατοντάδες.(12) Η προέλευση των ίδιων των γονιδίων AMR είναι περιβαλλοντικά βακτήρια (ιδιαίτερα βακτήρια του εδάφους), τα οποία υποτίθεται ότι είναι εκείνα που έχουν συνεξελιχθεί με τους σχετικούς οργανισμούς παραγωγής αντιμικροβιακών για χιλιετίες.(13–15) Ωστόσο, τυπικά υπάρχει μια καθυστέρηση αρκετών ετών μεταξύ της κλινικής χρήσης ενός φαρμάκου και της άφιξης σχετικών κινητών γονιδίων AMR σε πληθυσμούς ανθρώπινων παθογόνων.(16) Εκατοντάδες κινητά γονίδια AMR έχουν βρεθεί στην *K. pneumoniae* (2,17), το είδος που σχετίζεται με τις πρώτες αναφορές πολλών γονιδίων AMR πριν από τη διασπορά τους μεταξύ άλλων κλινικά σχετικών Gram αρνητικών.

Το 2014, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) δημοσίευσε μια έκθεση όπου ανέφερε ότι τα CRKP στελέχη έχουν εξαπλωθεί σε όλες τις περιοχές του κόσμου.(18)

Το 2017 το CDC αναφέρει ότι σχεδόν όλα τα κράτη έχουν αναφέρει περιπτώσεις απομόνωσης μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάση KPC.(19)

Κατά την περίοδο 2016–2020 αναφέρθηκε αυξητική τάση για την αντοχή στην καρβαπενέμη στην *K. pneumoniae*.(20)

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συνέβαλαν στην ταχεία εξάπλωση των CRKP στελεχών, όπως τα πλασμιδιακά γονίδια και τα ευρέως διαδεδομένα διεθνή ταξίδια. (21)

Ενώ αρχικά, οι λοιμώξεις αυτές εκδηλώθηκαν ως σποραδικά κρούσματα στις βορειοανατολικές Ηνωμένες Πολιτείες, σήμερα έχουν εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο και σε μερικές χώρες όπως η Ιταλία και η Ελλάδα έχουν λάβει ενδημικές διαστάσεις.(22)

## 1. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ *Enterobacteriaceae*

Τα Εντεροβακτηριακά είναι μία μεγάλη οικογένεια Gram-αρνητικών βακτηρίων που συμπεριλαμβάνει μικροοργανισμούς οι οποίοι βρίσκονται στο έδαφος, το νερό και τη βλάστηση, και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των περισσότερων ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Τα Εντεροβακτηριακά είναι τα πιο συχνά βακτηριακά στελέχη που απομονώνονται από τα κλινικά δείγματα. Κάποια μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών σχετίζονται πιο συχνά με ασθένειες στον άνθρωπο (όπως: *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia spp.*) από άλλα (όπως: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*). Τα δεύτερα είναι μέλη της φυσιολογικής συμβιωτικής χλωρίδας, που σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε ανθρώπους, με ήπια συμπτώματα έως και σοβαρές λοιμώξεις με θανατηφόρα σηψαιμία. Άλλα βακτήρια, της οικογένειας αυτής, που προκαλούν ασθένειες συμπεριλαμβάνουν τα *Enterobacter*, *Serratia* και *Citrobacter*. Νοσηλευόμενα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ειδικά ασθενείς που λαμβάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία, συχνά αποικίζονται από Gram αρνητικούς βάκιλλους συμπεριλαμβανομένων και των εντεροβακτηριακών, με συχνό αποτέλεσμα την πρόκληση λοίμωξης.

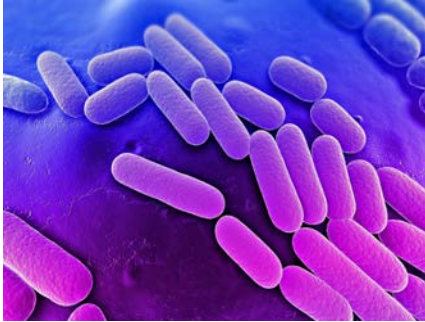
### 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η οικογένεια αυτή είναι η μόνη αντιπροσωπευτική της τάξης των *Enterobacteriales*, κλάσης *Gammaproteobacteria* και φύλου *Proteobacteria*. Συμπεριλαμβάνει πολλά γένη με εκατοντάδες είδη.

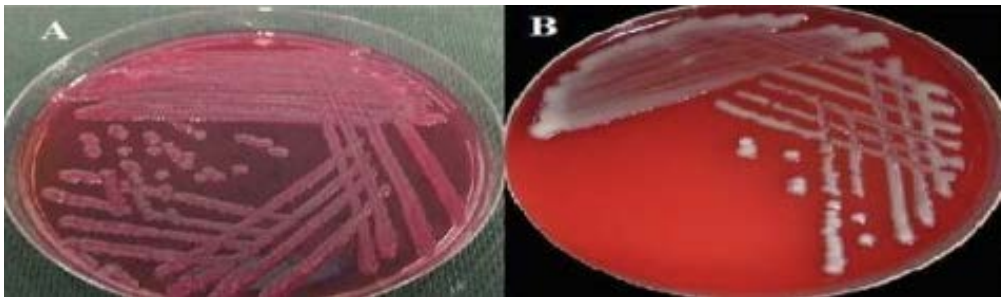
Τα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών έχουν αρκετές κοινές ιδιότητες. Είναι όλα Gram-αρνητικοί, αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι, μη σπορογόνοι βάκιλοι, ραβδοειδείς, ευθύγραμμοι ή καμπυλοειδείς σχετικά μικρού μεγέθους με διαστάσεις 2-3μm x 0,4-0,6μm.

Αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά και διασπούν τη γλυκόζη ενζυματικώς, με παραγωγή οξέος ή οξέος και αερίων. Στο MacConkey άγαρ, που περιέχει λακτόζη, οι αποικίες μπορεί να είναι ροζ, υποδεικνύοντας ότι οι μικροοργανισμοί ζυμώνουν τη λακτόζη ή ωχρές εάν οι μικροοργανισμοί δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. Τα Εντεροβακτηριακά παράγουν καταλάση, αλλά όχι οξειδωτικά ένζυμα και μετατρέπουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη. Είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα και για αυτό επιζούν στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο. Αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών θερμοκρασίας και pH. Τα περισσότερα Εντεροβακτηριακά είναι κινητά με περίτριχα μαστίγια, αλλά κάποια (π.χ. *Shigella* και *Klebsiella*) είναι ακίνητα.

Διαφοροποιούνται εύκολα εργαστηριακά από τις βιοχημικές, αντιγονικές και γενετικές διαφορές τους. Επίσης, ποικίλουν από άποψη ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.(23)



**Εικόνα 1:** *Klebsiella pneumoniae* (24)



**Εικόνα 2:** Καλλιέργεια *Klebsiella pneumoniae* σε MacConkey άγαρ (A) και αιματούχο άγαρ (B).(25)

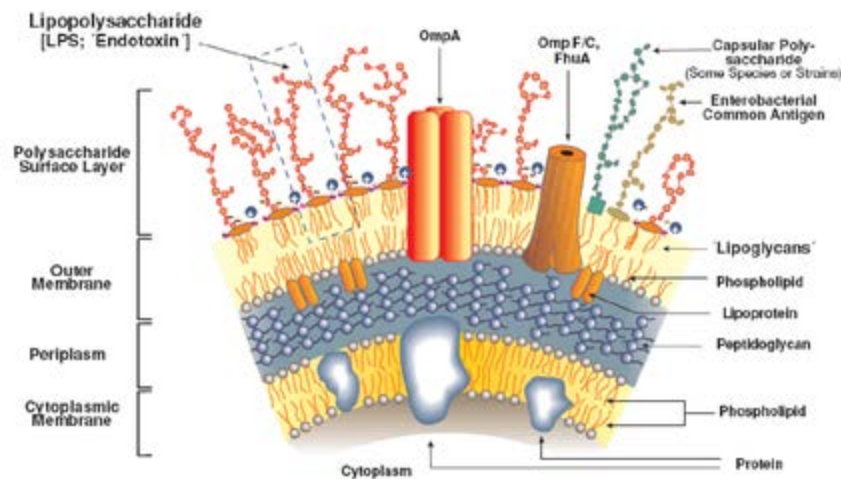
## 1.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ

Τα σημαντικά δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των Εντεροβακτηριακών είναι (Εικόνα 3):

- Η εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη
- Η στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης
- Η εξωτερική μεμβράνη αποτελούμενη από δύο στοιβάδες: μία στοιβάδα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών και μία εξωτερική στοιβάδα λιποπολυσακχαριτών (LPS).

Πολλοί μικροοργανισμοί, όπως η *Klebsiella spp.* και ένας αριθμός από στελέχη *E.coli*, διαθέτουν μία επιπλέον στοιβάδα το έλυτρο.

Μερικά Εντεροβακτηριακά διαθέτουν μαστίγια, πρωτεϊνικές δομές που δίνουν κίνηση στα βακτήρια. Επιπλέον, η παρουσία κροσσών, επίσης πρωτεϊνικής φύσης, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην προσήλωση ή την προσκόλληση στο βλεννογόνο.



**Εικόνα 3:** Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο λιπιδικών διπλοστοιβάδων, την εξωτερική και την εσωτερική ή κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από τον περιπλασμικό χώρο που περιέχει το τρισδιάστατο δίκτυο της πεπτιδογλυκάνης.(26)

### 1.2.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι σημαντικό κομμάτι του κυτταρικού περιβλήματος, είναι το όριο μεταξύ κυτταροπλάσματος και περιβάλλοντος, και είναι πρωτίστως υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ροής θρεπτικών συστατικών και προϊόντων μεταβολισμού μέσα και έξω από το κύτταρο. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη συμμετέχει στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό του βακτηρίου. Τα χημικά συστατικά της πεπτιδογλυκάνης, LPS και φωσφολιπιδίων συντίθενται από ένζυμα μέσα σε αυτή την μεμβράνη.(27)

Η πεπτιδογλυκάνη σχηματίζει μία λεπτότερη στοιβάδα στα Gram-αρνητικά βακτήρια και αποτελείται από ένα δίκτυο στο οποίο γραμμικές αλυσίδες αμινοσακχάρων που περιέχουν εναλλασσόμενα κατάλοιπα N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης και N-ακετυλ-μουραμικού οξέος συνδέονται σε τετραπεπίδια.(28) Η στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης διατηρεί το σχήμα των βακτηρίων.(29)

Ο περιπλασματικός χώρος βρίσκεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης. Μέσα σε αυτόν εκτελείται ένας αριθμός διεργασιών που είναι ζωτικές για την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Αλλαγές στην εξωτερική μεμβράνη ή στους LPS επιτρέπουν την απελευθέρωση των περιπλασματικών ενζύμων και δεσμευτικών πρωτεϊνών, που παίζουν ρόλο στην προστασία και την αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και άμυνας του ξενιστή.(30)

Η εξωτερική μεμβράνη των Εντεροβακτηριακών σχηματίζεται από μία ασύμμετρη διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων (31) και LPS.(31,32) Τα υδρόφοβα μέρη των μορίων LPS βρίσκονται προς το περιβάλλον, ενώ τα υδρόφιλα μέρη αλληλεπιδρούν με τα υδρόφιλα μέρη των φωσφολιπιδίων. Τα μόρια LPS αποτελούνται από τρεις περιοχές: την ειδική αλυσίδα πολυσακχαριδίου O, τον πυρήνα και το λιπίδιο A. Το ειδικό πολυσακχαρίδιο O είναι χημικά μοναδικό για κάθε τύπο οργανισμού και προσδίδει ορολογική ιδιαιτερότητα σε έναν οργανισμό. Αποτελείται από 20-40 επαναληπτικές μονάδες ολιγοσακχαριδίων που το καθένα περιέχει από δύο ως επτά διαφορετικά μονοσακχαρίδια διασυνδεδεμένα με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η περιοχή του πυρήνα, που παρουσιάζει μικρότερη μεταβλητότητα σε σχέση με την ειδική αλυσίδα-O και είναι συχνά ταυτόσημη σε μεγάλες ομάδες Gram-αρνητικών βακτηρίων, περιέχει δεοξυ-σάκχαρο, 2-κετο- δεοξυτονικό οξύ και επτόζη. Ο πυρήνας συνδέει την αλυσίδα πολυσακχαριδίου και το λιπίδιο A. Το λιπίδιο A είναι η πιο διατηρημένη περιοχή των λιποπολυσακχαριτών και η βασική δομή είναι ίδια σε διάφορα Gram-αρνητικά βακτήρια. Το λιπίδιο A είναι υπεύθυνο για τις βιολογικές ιδιότητες της ενδοτοξίνης.

## 1.2.2 ΕΛΥΤΡΟ

Δύο τύποι πολυσακχαριδίων του ελύτρου έχουν βρεθεί στα Εντεροβακτηριακά. Το αντιγόνο M (αντιγόνο βλεννογόνου) παράγεται από τα περισσότερα εντερικά βακτήρια, πιθανότατα για προστασία από την ξήρανση. Το αντιγόνο M δεν είναι ειδικό και ορολογικά δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ διάφορων μικροοργανισμών. Σε αντίθεση, τα πολυσακχαρίδια αντιγόνου K έχουν δομές ειδικές για κάθε ορότυπο μέσα σε ένα είδος και πιθανότατα βοηθούν αυτά τα βακτήρια να αποφύγουν την φαγοκύτωση.(33,34)

### 1.2.3 ΜΑΣΤΙΓΙΑ

Πολλά μέλη των *Enterobacteriaceae* διαθέτουν δομές πρωτεϊνικής φύσεως που αποκαλούνται μαστίγια και παρέχουν στα βακτήρια κινητικότητα.(30) Τα μαστίγια περιέχουν το θερμοευαίσθητο αντιγόνο H το οποίο υπερισχύει του αντιγόνου O.(34)

### 1.2.4 ΚΡΟΣΣΟΙ

Η παρουσία κροσσών στα βακτήρια αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την προσήλωση ή την προσκόλληση στο βλεννογόνο του πεπτικού, αναπνευστικού ή ουρογεννητικού σωλήνα και στα ερυθροκύτταρα (προκαλώντας αιμοσυγκόλληση). Αυτές οι προσκολλητικές ιδιότητες των βακτηρίων που φέρουν κροσσούς παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον βακτηριακό αποικισμό των επιθηλιακών επιφανειών και ως εκ τούτου αναφέρονται ως παράγοντες αποικισμού.(30)

## 1.3 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *Enterobacteriaceae*

Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη: *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Dedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moerrela*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Providencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenohabtus*.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του είδους *Klebsiella pneumoniae*.



## 2. *Klebsiella spp.*

### 2.1 *Klebsiella spp* - ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η *K.pneumoniae* περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Γερμανό μικροβιολόγο και παθολόγο Carl Friedländer, ο οποίος βοήθησε στην ανακάλυψη της βακτηριακής αιτίας της πνευμονίας το 1882, για αυτό περιγραφόταν και ως βάκιλλος του Friedländer.

Το όνομα όμως *Klebsiella* δόθηκε προς τιμήν του Theodor Albrecht Edwin Klebs, ενός από τους ιδρυτές της μικροβιολογίας. Ο γιατρός παθολόγος και μικροβιολόγος Edwin Klebs (1834-1913) που γεννήθηκε στο Königsberg της Πρωσίας (τόρα Καλίνινγκραντ, Ρωσία), είχε δει βακτήρια στις αεροφόρους οδούς των ατόμων που πέθαναν από πνευμονία το 1875. Ωστόσο, το 1882, ο Friedländer αναγνώρισε ότι τα βακτήρια ήταν σχεδόν πάντοτε παρατηρήσιμα σε άτομα που πεθαίνουν από πνευμονία, και δήλωσε ότι αυτά ήταν η πιθανή αιτία της πνευμονίας.(35)

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella spp.* είναι μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών που στο σύνολό τους είναι αρνητικά κατά gram, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Είναι μη κινητά, ραβδωτά βακτήρια που έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσουν βλενώδεις αποικίες, με τη βοήθεια του πολυσακχαριδικού ελύτρου που διαθέτουν. Στα πλαίσια των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων η *Klebsiella*, όπως τα υπόλοιπα Εντεροβακτηριακά, ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, ανάγει τα νιτρικά, παράγει καταλάση, όχι οξειδάση, και είναι θετική στο Voges Proskauer τεστ.(23)

Είναι γνωστό στους κλινικούς ιατρούς ότι η *Klebsiella* αποτελεί ένα από τα αίτια βακτηριακής πνευμονίας της κοινότητας προσβάλλοντας συνήθως χρόνιους αλκοολικούς με χαρακτηριστικές ακτινογραφικές εικόνες και έχει υψηλό ποσοστό θνητότητας αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα. Παρ' όλα αυτά η πλειοψηφία των λοιμώξεων από *Klebsiella* παρατηρείται στο νοσοκομειακό περιβάλλον και αποτελεί ένα βασικό αίτιο νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η *Klebsiella spp* ως ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο προσβάλλει ανοσοκατασταλμένα άτομα που νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα και πάσχουν από σοβαρά υποκείμενα νοσήματα όπως σακχαρώδη διαβήτη ή χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

Οι περισσότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις από *Klebsiella* προκαλούνται από το πιο σημαντικό είδος του γένους, την *Klebsiella pneumoniae*, η οποία προκαλεί συνήθως ουρολοιμώξεις, πνευμονία, σηψαιμία και λοιμώξεις μαλακών μορίων. Οι κύριοι παθογενετικοί μηχανισμοί διασποράς του μικροβίου, που αποτελούν άλλωστε και τις δεξαμενές όπου αυτό έχει βρεθεί, είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των ασθενών και τα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού. Εξαιτίας της ικανότητας του μικροβίου να διασπείρεται ταχέως στο

νοσοκομειακό περιβάλλον, η *K. pneumoniae* αρκετά συχνά αποτελεί αίτιο νοσοκομειακών επιδημιών. Τα τελευταία χρόνια έχουν παρατηρηθεί τέτοιου είδους επιδημίες νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη (MDR) σε Μονάδες Νεογνών, σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας ενηλίκων, σε Μονάδες Αυξημένης Φροντίδας χειρουργημένων ασθενών καθώς και σε παθολογικές και χειρουργικές κλινικές. Η MDR *K. pneumoniae* αναφέρεται σε νέους τύπους στελεχών, όπως αυτών που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs- Extended spectrum β-lactamases), ή των ανθεκτικών στην καρβαπενέμη (carbapenem resistant) στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες. Η συχνότητα των ESBL στελεχών του μικροβίου σε κλινικό επίπεδο, έχει αυξηθεί σταθερά με την πάροδο των χρόνων. Παράλληλα, έχουν εισβάλλει στο νοσοκομειακό περιβάλλον τα νέα στελέχη που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, λαμβάνοντας τα τελευταία χρόνια ανησυχητικές διαστάσεις και μάλιστα σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τέτοια στελέχη είναι ιδιαίτερα απειλητικές για την ζωή των νοσηλευόμενων ασθενών, με μικρά ποσοστά επιβίωσης, εξαιτίας των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών.

## 2.2 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ *Klebsiella spp*

Τα δύο παθογόνα μέλη του γένους που είναι η *K. pneumoniae* και η *K. oxytoca* είναι υπεύθυνα για ανθρώπινες λοιμώξεις. Είναι ευκαιριακά παθογόνα και βρίσκονται στο περιβάλλον αλλά και το δέρμα και τους βλεννογόνους των θηλαστικών. Η κυριότερη δεξαμενή του μικροβίου είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των ασθενών και τα χέρια του προσωπικού των νοσοκομείων. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να διαδοθούν ταχέως, οδηγώντας συχνά σε νοσοκομειακές επιδημίες.

Οι λοιμώξεις από *Klebsiella pneumoniae* αφορούν κυρίως τους πνεύμονες, όπου προκαλούν σημαντική καταστροφή του πνευμονικού ιστού, νέκρωση, φλεγμονή και αιμορραγία παράγοντας πολλές φορές αιματηρά και βλενώδη πτύελα που χαρακτηρίζονται σαν πτύελα ζελέ (currant jelly sputum). Η νόσος πλήττει κυρίως μεσήλικα και ηλικιωμένα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα όπως αλκοολικούς, διαβητικούς και ασθενείς με χρόνια βρογχοπνευμονία.

Η *K. pneumoniae* ενοχοποιείται επίσης για λοιμώξεις ουροποιητικού, χοληφόρων οδών και επιμολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων.

Το φάσμα των κλινικών συνδρόμων περιλαμβάνει πνευμονία, βακτηριαμία, θρομβοφλεβίτιδα, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (UTI), χολοκυστίτιδα, διάρροια, λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού, μόλυνση τραυμάτων, οστεομυελίτιδα, και μηνιγγίτιδα. Η

παρουσία προσθετικών συσκευών, η μόλυνση του αναπνευστήρα, η χρήση ουροκαθετήρα και η χρήση των αντιβιοτικών είναι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης νοσοκομειακών λοιμώξεων με είδη *K. pneumoniae*.

Η *K. oxytoca* προκαλεί πληθώρα νοσοκομειακών λοιμώξεων. Έχει εμπλακεί με τη νεογνική βακτηριαμία, ειδικά μεταξύ πρόωρων βρεφών και νεογνών σε μονάδες εντατικής θεραπείας.

Το ρινοσκλήρωμα είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διεργασία που αφορά το ρινοφάρυγγα και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη οζιδίων και όγκων στο βλεννογόνο του ρινοφάρυγγα, της υπερώας, της γλωττίδας αλλά και της κατώτερης αναπνευστικής οδού. Προκαλείται από το είδος *K. rhinoscleromatis* και παρατηρείται σε υποανάπτυκτες περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας, ενώ μεταδίδεται από άτομο σε άτομο με στενή επαφή. Απαιτείται διαφορική διάγνωση από άλλες κοκκιωματώδεις νόσους όπως η φυματίωση, η λέπρα, μυκητιασικές λοιμώξεις, κοκκιωματώση Wegener, κακοήθη νοσήματα και σαρκοείδωση. Η βιοψία της βλάβης δείχνει κοκκιωματώδη φλεγμονή με παρουσία αφρωδών κυττάρων (Milkulicz cells) που περιέχουν ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς.(36)

Η *K. ozaenae* αποικίζει φυσιολογικά τον ρινοφάρυγγα σε υγιή άτομα. Έχει συσχετιστεί με την χρόνια ατροφική ρινίτιδα (ozena) και χαρακτηρίζεται από νέκρωση του ρινικού βλεννογόνου και ρινική καταρροή. Το βακτήριο έχει απομονωθεί και σε ασθενείς που πάσχουν από άλλες λοιμώξεις όπως μέση ωτίτιδα, μαστοειδίτιδα, πνευμονοφρίτιδα, κυστίτιδα, λοιμώξεις μαλακών μορίων, βακτηριαμία, ουδετεροπενία, πνευμονία και μηνιγγίτιδα.(37,38)

Η *K. granulomatis*, παλιά γνωστή ως *Calymmatobacterium granulomatis*, προκαλεί το χρόνια ελκώδες κοκκίωμα στην περιγεννητική περιοχή.

## 2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ *K. pneumoniae*

Η έρευνα όσον αφορά τους παθογενετικούς μηχανισμούς των λοιμώξεων που προκαλούνται από την *K. pneumoniae*, έχει αναδείξει ένα αριθμό παραγόντων του βακτηρίου που συνεισφέρουν στην ικανότητα του να προκαλεί νόσο, δηλαδή στην παθογονικότητά του. Όλα τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν in vitro και in vivo προσπάθησαν να διερευνήσουν την αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίου και ξενιστή. Οι παράγοντες παθογονικότητας του μικροβίου περιγράφονται παρακάτω.

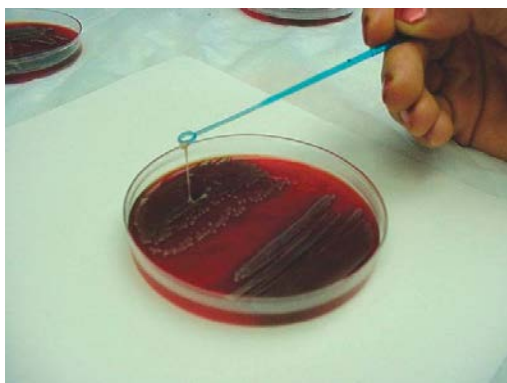
### 2.3.1 ANΤΙΓΟΝΟ ΚΑΨΑΣ (Capsular Antigen)

Το αντιγόνο της κάψας του μικροβίου αποτελείται από πολυσακχαρίτες (4-6 σάκχαρα), η σύνθεση των οποίων εξαρτάται από το στέλεχος του μικροβίου. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 79 διαφορετικοί ορολογικοί τύποι πολυσακχαριτών της *K. pneumoniae* που ονομάζονται Κ αντιγόνα.(39)

Μπορεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των αντιγόνων Κ που παράγονται από την *K. pneumoniae* και της σοβαρότητας της μόλυνσης, ειδικά σε λοιμώξεις της κοινότητας. Από τους 78 ορότυπους που έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής, υπάρχει υπερεκπροσώπηση ορισμένων οροτύπων, καθώς μόνο 25 ορότυποι αποτελούν πάνω από το 70% των στελεχών που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα (225). Με βάση τους πιο συχνά απομονωμένους ορότυπους που συλλέγονται από ασθενείς και τα αποτελέσματα από πειράματα σε ποντίκια, τα στελέχη Κ1 και Κ2 είναι γενικά πιο μολυσματικά από τα στελέχη άλλων οροτύπων.(40–42) Τα στελέχη Κ2 είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος στελέχους *K. pneumoniae* που απομονώνεται κλινικά, ακολουθούμενος από τα στελέχη Κ1.(43)

Ο βαθμός λοιμογονικότητας που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο ορότυπο Κ αντιγόνου, σχετίζεται με τη συγκέντρωση της μαννόζης στην πολυσακχαριδική κάψα. Έτσι, έχει βρεθεί σε πειραματικά μοντέλα, ότι οι τύποι πολυσακχαριδικής κάψας (π.χ Κ2), που εμφανίζουν υψηλή λοιμογονικότητα στερούνται δομών μαννόζη-α-2/3-μαννόζη οι οποίες παρατηρούνται σε τύπους κάψας με λιγότερη λοιμογονικότητα.(44) Οι δομές μαννόζη-α-2/3-μαννόζη αναγνωρίζονται από μία λεκτίνη της επιφάνειας των μακροφάγων που μεσολαβεί στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και τη φαγοκυττάρωση. Έτσι στελέχη που στερούνται αυτών των δομών (όπως αυτά με το Κ2 αντιγόνο) δεν αναγνωρίζονται από τα μακροφάγα και διαφεύγουν τη φαγοκυττάρωση. Σε μια μελέτη βρέθηκε ότι ο φαινότυπος ο οποίος φέρει το γονίδιο *mpA* (mucoid phenotype), το οποίο ρυθμίζει την παραγωγή βλέννης, ήταν 1000 φορές πιο λοιμογόνος σε σχέση με στελέχη, τα οποία δεν έφεραν το συγκεκριμένο γονίδιο.(45) Το γονίδιο *mpA* ρυθμίζει στους βλενώδεις (Εικόνα 4) φαινοτύπους την ενίσχυση της πολυσακχαριδικής κάψας προστατεύοντας έτσι σε μεγαλύτερο βαθμό τα βλενώδη στελέχη από τη φαγοκυττάρωση από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα και τη βακτηριοκτόνο δράση του ορού.(46)

Οι πρόσφατες εξελίξεις στις μοριακές τεχνικές οδήγησαν σε περαιτέρω διάκριση μεταξύ των καψιδικών τύπων της *K. pneumoniae* καθώς και στην πλήρη αλληλούχιση του γονιδιακού τύπου που κωδικοποιεί την κάψα (*cps-capsular polysaccharide synthesis*). (47)



**Εικόνα 4:** Βλενώδης φαινότυπος *K.pneumoniae*: Όταν γίνεται προσπάθεια αποκόλλησης μιας αποικίας με τον κρίκο οι αποικίες παραμένουν προσκολλημένες στον κρίκο καθώς τον απομακρύνουμε από το άγαρ.(48)

Ο ρόλος της κάψας στη λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae* είναι πολύ μεγάλος. Έχουν οριστεί πολλές διαφορετικές λειτουργίες της κάψας. Πρώτον η κάψα λειτουργεί σαν φραγμός και αποτρέπει τη φαγοκυττάρωση του μικροβίου από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.(49) Τα υλικά της κάψας σχηματίζουν χονδρές δεσμίδες που μαζί με τα ινίδια καλύπτουν την επιφάνεια του μικροβίου σαν ένα παχύ στρώμα. Αυτό το στρώμα προστατεύει το μικρόβιο από τη φαγοκύτωση από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα και προλαμβάνει το θάνατο του μικροβίου από βακτηριοκτόνους παράγοντες του ορού του ξενιστή.(50,51) Δεύτερον παρεμποδίζει τη βακτηριοκτόνο δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως οι ανθρώπινες βήτα defensins 1 έως 3 και η λακτοφερρίνη δεσμεύοντας αυτά τα μόρια μακριά από την εξωτερική μεμβράνη. Τρίτον εμποδίζει τα συστατικά του συμπληρώματος, όπως το C3, να αλληλεπιδράσουν με τη μεμβράνη, αποτρέποντας έτσι τη λύση και την οψωνοποίηση που προκαλείται από το συμπλήρωμα. Τέλος αποτρέπει την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, όπως φαίνεται από τη μειωμένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS- Reactive oxygen species), IL-8, IL-6 και TNF- $\alpha$ , βοηθώντας στην ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που εξαρτάται από το NOD (NOD-dependent pathway) και προστατεύοντας το LPS από την αναγνώριση του από τους υποδοχείς των ανοσοκυττάρων.(43)

### 2.3.2 ΙΝΙΔΙΑ (Fimbriae)

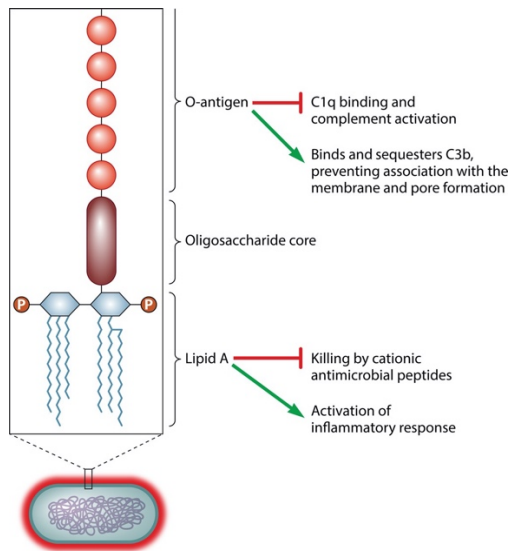
Το πρώτο βήμα στην διεργασία μιας φλεγμονής είναι η προσκόλληση του μικροβίου στα κύτταρα του ξενιστή, η οποία επιτελείται με την βοήθεια δομών που υπάρχουν στην επιφάνεια των μικροβίων και καλούνται ινίδια ή φίμπρια. Αυτές οι δομές είναι λεπτές προεκτάσεις της βακτηριακής επιφάνειας μήκους 10µm και διαμέτρου από 1 έως 11nm,(52) και αποτελούνται από μία πρωτεΐνη την πιλίνη.(53)

Στην *K. pneumoniae*, τα ινίδια τύπου 1 και 3 είναι οι κύριες δομές που έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντες παθογένειας. Άλλες τέσσερις δομές έχουν σημειωθεί για την *K. pneumoniae*, που περιλαμβάνουν το ινίδιο KPF-28, τον παράγοντα που ονομάζεται CF29K και ένα υλικό που μοιάζει με κάψουλα.(54–56)

Με τα ινίδια το μικρόβιο προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού, αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος του ξενιστή. Ο τύπος 1 των ινιδίων διαθέτει επιπλέον την ικανότητα να προσκολλάται σε διαλυτές γλυκοπρωτεΐνες των ούρων που περιέχουν μαννόζη, όπως η Tamm Horsfall ή και στο σάλιο, δικαιολογώντας τον αποικισμό της ουροποιογεννητικής και αναπνευστικής οδού από αντίστοιχα στελέχη, διαταραχή της υπάρχουσας χλωρίδας και επακόλουθη πρόκληση λοίμωξης σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου (σακχαρώδης διαβήτης, μηχανικός αερισμός, κ.λ.π.).(43)

### 2.3.3 ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS αποτελείται από τρία κύρια τμήματα: το λιπίδιο A, το ολισακχαρίδιο του πυρήνα και το αντιγόνο O (επαναλαμβανόμενη πλάγια αλυσίδα ολιγοσακχαριτών).(57) Το αντιγόνο O χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των οροτύπων του μικροβίου. Στην *K. pneumoniae* υπάρχουν εννέα κύριοι O ορότυποι. Τρεις από αυτούς, οι O1, O2 και O3, ευθύνονται για σχεδόν το 80% όλων των λοιμώξεων από *Klebsiella*. (Εικόνα 5) (58)



**Εικόνα 5:** Ο ρόλος του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στη λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae* (43)

Το λιπίδιο Α, γνωστό και ως ενδοτοξίνη, είναι το βιολογικά ενεργό τμήμα του μορίου καθώς αναγνωρίζεται από τον ξενιστή και βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του μικροβίου. Ο πυρήνας είναι συνέχεια του λιπιδίου Α, αποτελείται από ένα ζεύγος 8 υδρογονανθράκων γνωστών ως Kdo και μεταπίπτει στην πλάγια αλυσίδα του ολιγοσακχαρίτη Ο.

Το λιπίδιο Α εισέρχεται στη βακτηριακή μεμβράνη και είναι ένας δυναμικά ισχυρός ενεργοποιητής της φλεγμονής. Η *K. pneumoniae* μπορεί να τροποποιήσει το λιπίδιο Α για να το κάνει λιγότερο φλεγμονώδες κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και το λιπίδιο Α μπορεί επίσης να προστατεύσει από τη βακτηριοκτόνο δράση των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων.(43)

Η *K. pneumoniae* αναγνωρίζεται και ενεργοποιεί την κλασσική και την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος και την οδό λεκτίνης, αν και υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τα διάφορα στελέχη *K. pneumoniae*.(59–61) Το LPS είναι το κύριο μέσο προστασίας από το συμπλήρωμα.(62) Τα στελέχη *K. pneumoniae* με μικρού μήκους Ο αντιγόνο ή με απουσία του Ο αντιγόνου (τραχύς – rough LPS) είναι ευαίσθητα στο συμπλήρωμα ορού, ενώ τα στελέχη με Ο αντιγόνο πλήρους μήκους (ομαλό- smooth LPS) είναι ανθεκτικά στο συμπλήρωμα ορού.(63)

Συγκεκριμένα, τα ανθεκτικά στο συμπλήρωμα στελέχη ενεργοποιούν τον καταρράκτη του συμπληρώματος αλλά δεν είναι επιρρεπή σε θανάτωση λόγω του Ο αντιγόνου του LPS. Το αντιγόνο Ο προστατεύει από το C3 δεσμεύοντας το C3b, ένα συστατικό του συμπληρώματος που είναι ταυτόχρονα οψωνίνη και μέρος της διαδικασίας σχηματισμού πόρων πολύ μακριά από τη βακτηριακή μεμβράνη και ακυρώνει το σχηματισμό πόρων.(63–66) Επιπλέον η απουσία

του αντιγόνου Ο καθιστά τα βακτήρια πιο ευαίσθητα στη δέσμευση του C1q στην κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κλασικής οδού.(67)

Οι μεταβολές στο LPS μπορούν επίσης να διαδραματίσουν ρόλο στην προστασία των βακτηριδίων από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών όπως της πολυμυξίνης.(68) Ως πρωτεύον συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης της *K. pneumoniae*, το LPS θεωρείται μέρος του γονιδιώματος πυρήνα.

Τέλος, ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), που ονομάζεται επίσης ενδοτοξίνη, αναγνωρίζεται ευρέως ως ο πιο ισχυρός διαμεσολαβητής σηπτικού σοκ που προκαλείται από βακτήρια. Η αντίληψη του LPS μέσω του υποδοχέα Toll-like receptor 4 (TLR4) του ξενιστή οδηγεί σε έναν φλεγμονώδη καταρράκτη.(69) Αυτή η αντίδραση ξενιστή είναι που οδηγεί στην καταστροφική παθολόγηση της σηψαιμίας και του σηπτικού σοκ παρα το ίδιο το LPS.

### 2.3.4 ΣΙΔΗΡΟΦΟΡΑ (Siderophores)

Ο σίδηρος που απαιτείται για την επικράτηση της *K. pneumoniae* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης πρέπει να ληφθεί από το περιβάλλον. Αυτό το μέταλλο δεν είναι άμεσα διαθέσιμο στον ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης κυρίως επειδή ως μέρος της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης ο ξενιστής το δεσμεύει για να περιορίσει την ανάπτυξη ενός αριθμού πιθανών παθογόνων.(70,71) Κανονικά υπάρχει ελάχιστος ελεύθερος σίδηρος στο πλάσμα του ξενιστή καθώς αυτός συνδέεται ενδοκυττάρια με πρωτεΐνες όπως η αιμοσφαιρίνη, η φερριτίνη, η αιμοσιδηρίνη και η μυοσφαιρίνη και εξωκυττάρια με υψηλής συγγένειας συνδεόμενες πρωτεΐνες όπως η λακτοφερίνη και η τρανσφερίνη.

Επομένως η *K. pneumoniae* όπως και πολλά άλλα βακτηριακά παθογόνα πρέπει να εφαρμόζει τακτικές για την απόκτηση σιδήρου από τον ξενιστή προκειμένου να επιβιώσει και να διαδοθεί κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Η κυρίαρχη τακτική που χρησιμοποιείται από πολλά παθογόνα, συμπεριλαμβανομένης και της *K. pneumoniae*, για την απόκτηση σιδήρου είναι μέσω της έκκρισης σιδηροφόρων. Τα σιδηροφόρα είναι μόρια (χαμηλού μοριακού βάρους χηλικοί παράγοντες) που διαθέτουν υψηλότερη συγγένεια για το σίδηρο από τις πρωτεΐνες μεταφοράς του ξενιστή. Έτσι μπορούν να δεσμεύσουν ιόντα σιδήρου από τις σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες ή να τον πάρουν από το περιβάλλον.(72)

Τα στελέχη *K. pneumoniae* κωδικοποιούν αρκετά σιδηροφόρα. Η έκφραση και η συμβολή κάθε σιδηροφόρου στη λοιμογόνο δύναμη ποικίλλει. Η παραγωγή περισσότερων του ενός σιδηροφόρων από την *K. pneumoniae* μπορεί να είναι ένα μέσο επιτυχούς αποικισμού διαφορετικών ιστών ή/και αποφυγής εξουδετέρωσης ενός σιδηροφόρου από τον



ξενιστή.(72,73) Αρκετά σιδεροφόρα εκφράζονται στην *K. pneumoniae*, συμπεριλαμβανομένης της εντεροβακτίνης (enterobactin), της yersiniabactin, της σαλμοχελίνης (salmochelin) και της αεροβακτίνης (aerobactin). Η συγγένεια αυτών των σιδεροφόρων με το σίδηρο κυμαίνεται από την αεροβακτίνη με τη χαμηλότερη έως την εντεροβακτίνη με την υψηλότερη.(74,75)

Για το γένος *Klebsiella*, η εντεροβακτίνη παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη, χωρίς όμως να συνδέεται με αυξημένη νοσογόνο δράση. Αντιθέτως η αεροβακτίνη παράγεται σπανιότερα, αλλά η συμβολή της στη νοσογόνο δράση του μικροβίου είναι σαφώς τεκμηριωμένη.(76)

## 2.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ *K. pneumoniae*

Μέσα σε ένα βακτηριακό είδος, υπάρχει συνήθως ένα σύνολο γονιδίων που διατηρείται μεταξύ όλων των μελών. Αυτό το σύνολο γονιδίων θεωρείται το βασικό γονιδίωμα του πυρήνα (core genome). Στην *K. pneumoniae* το γονιδίωμα του πυρήνα, που είναι παρών σε >95% των απομονώσεων, υπολογίζεται επί του παρόντος ότι αποτελείται από περίπου 2.000 γονίδια.(17) Τα γονίδια που ποικίλλουν μεταξύ των απομονώσεων αναφέρονται ως βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome). Αυτό περιλαμβάνει χρωμοσωμικά κωδικοποιημένα γονίδια και γονίδια σε πλασμίδια. Τα γονιδιώματα της *K. pneumoniae* είναι τυπικά μεταξύ 5.000 και 6.000 γονιδίων, που σημαίνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος αποτελείται από βοηθητικά γονίδια. Τα γονίδια στο βοηθητικό γονιδίωμα μπορούν να βοηθήσουν σε συγκεκριμένες διαδικασίες, όπως η δέσμευση αζώτου.(77) Μπορούν επίσης να κωδικοποιήσουν συγκεκριμένους παράγοντες λοιμογόνου δράσης. Το βοηθητικό γονιδίωμα φέρει επίσης γονίδια που κωδικοποιούν διάφορα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ένζυμα και μηχανισμούς.(78) Τα βοηθητικά γονίδια μπορούν να αποκτηθούν μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των βακτηριακών ειδών, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία γονιδιωματικών νησιδίων (genomic islands) και κινητών γενετικών στοιχείων σε πολλά απομονωμένα στελέχη. Τα γονίδια που κωδικοποιούνται σε γονιδιωματικά νησιά μπορούν να βοηθήσουν τα απομονωμένα στελέχη να προσαρμοστούν σε συγκεκριμένες θέσεις μόλυνσης ή αποικισμού.(79–81)

Η *Klebsiella pneumoniae* είναι ένα Gram αρνητικό παθογόνο που έχει ένα μεγάλο βοηθητικό γονιδίωμα από πλασμίδια και χρωμοσωμικούς γονιδιακούς τόπους. Αυτό το βοηθητικό γονιδίωμα διαιρεί τα στελέχη *K. pneumoniae* σε ευκαιριακά (opportunistic), υπερμολυσματικά (hypervirulent) και πολυανθεκτικά (multidrug-resistant) και διαχωρίζει την *K. pneumoniae* από δύο στενά συγγενικά είδη, τα *Klebsiella variicola* και *Klebsiella quasipneumoniae*. Ορισμένα στελέχη *K. pneumoniae* δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα μολύνοντας βαρέως πάσχοντες και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Αυτά τα στελέχη *K.*

*pneumoniae* είναι μια κοινή αιτία λοιμώξεων και σχετίζονται με νοσήματα όπως πνευμονία, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και λοιμώξεις του αίματος. Τα είδη *K. variicola* και *K. quasipneumoniae* συχνά δεν διακρίνονται κλινικά από τα ευκαιριακά στελέχη *K. pneumoniae*. Άλλα στελέχη *K. pneumoniae* είναι υπερμολυσματικά, μολύνουν υγιή άτομα στην κοινότητα και προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις, όπως αποστήματα ήπατος, ενδοφθαλμίτιδα και μηνιγγίτιδα. Μια τρίτη ομάδα *K. pneumoniae* κωδικοποιεί καρβαπενεμάσες οι οποίες την καθιστούν ιδιαίτερα ανθεκτική στα αντιβιοτικά. Αυτά τα στελέχη δρουν ως ευκαιριακά αλλά είναι εξαιρετικά δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Όλες αυτές οι ομάδες της *K. pneumoniae* και των σχετικών ειδών μπορούν να αποικίσουν τη γαστρεντερική οδό και το βοηθητικό γονιδίωμα μπορεί να καθορίσει εάν ένα στέλεχος αποικισμού παραμένει ασυμπτωματικό ή εξελίσσεται για να προκαλέσει ασθένεια.(82)

Η αντοχή στις καρβαπενέμες οφείλεται κυρίως στο βοηθητικό γονιδίωμα, μερικές φορές σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του πυρήνα. Η αντοχή στις καρβαπενέμες στην *K. pneumoniae* μπορεί να μεσολαβηθεί εν μέρει μέσω της ρύθμισης των αντλιών εκροής (83) και της αλλαγής των πορινών της εξωτερικής μεμβράνης στο γονιδίωμα του πυρήνα (84) και της υπερπαραγωγής των ενζύμων ESBL ή AmpC β-λακταμασών στο βοηθητικό γονιδίωμα (Bush and Jacoby, 2010).(85) Για παράδειγμα η υπερπαραγωγή ενός ενζύμου ESBL ή AmpC σε συνδυασμό με μια μετάλλαξη πορίνης μπορεί να οδηγήσει σε φαινότυπο αντοχής, ιδιαίτερα στην ερταπενέμη.(86,87) Ο πιο ανησυχητικός μηχανισμός αντίστασης στην καρβαπενέμη είναι μέσω των καρβαπενεμάσων που προκαλούνται από πλασμίδια. Οι καρβαπενεμάσες KPC είναι καρβαπενεμάσες σερίνης κατηγορίας A και είναι οι πιο συχνές καρβαπενεμάσες που βρίσκονται στην *K. pneumoniae*.(88,89) Πρόσθετοι τύποι καρβαπενεμάσης έχουν επίσης εμφανιστεί στο βοηθητικό γονιδίωμα της *K. pneumoniae*. Η NDM-1 είναι μια μεταλλο-β-λακταμάση κατηγορίας B (MBL) που κωδικοποιείται από πλασμίδιο.(90) Οι παραλλαγές του γονιδίου VIM (*bla<sub>VIM</sub>*) φέρονται σε ιντεγκρόνια που μπορούν να ενσωματωθούν είτε στο χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια.(91,92) Παρόμοια με το *bla<sub>VIM</sub>*, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις παραλλαγές IMP (*bla<sub>IMP</sub>*) φέρονται σε ιντεγκρόνια και μπορούν να ενσωματωθούν είτε σε χρωμοσώματα είτε σε πλασμίδια.(93,94) Το πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο OXA-48 (*bla<sub>OXA-48</sub>*) βρίσκεται στην *K. pneumoniae* και προσδίδει υψηλό επίπεδο αντοχής στην ιμιπενέμη.(95)

### 3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα Gram αρνητικά μικρόβια έχουν στη διάθεσή τους πληθώρα μηχανισμών αντίστασης στις καρβαπενέμες και τις άλλες β-λακτάμες. Οι κυριότεροι μηχανισμοί είναι:

- η τροποποίηση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) (τροποποίηση στόχου δράσης)
- η παρεμπόδιση της εισόδου του φαρμάκου, συνήθως μέσω μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης
- η ενεργοποίηση αντλιών ενεργητικής αποβολής του αντιβιοτικού (αντλίες εκροής- efflux pumps).
- η παραγωγή β-λακταμασών που υδρολύουν την πενικιλίνη, τις κεφαλοσπορίνες και τις καρβαπενέμες (καρβαπενεμάσες).

Στα εντεροβακτηριακά, η μείωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και η παραγωγή β-λακταμασών είναι οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβανομένων και των καρβαπενεμών.

#### 3.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ (OMPs)

Η εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό περιβάλλον και λειτουργεί ως φραγμός στην είσοδο ουσιών όπως τα αντιβιοτικά.(96) Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά διέρχονται μέσω των πρωτεϊνικών πόρων της εξωτερικής μεμβράνης (Outer Membrane Porins, OMPs) για να αναστείλουν τα ένζυμα (τρανσπεπτιδάσες) που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της πεπτιδογλυκάνης. Αντοχή μπορεί να προκύψει από μείωση είτε της λειτουργικότητας είτε της έκφρασης των πρωτεϊνικών πόρων. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται σε ποικιλία μεταλλάξεων, είτε στα δομικά είτε στα αντίστοιχα ρυθμιστικά γονίδια.(97)

## 3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Η παραγωγή β-λακταμασών είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός άμυνας των Gram αρνητικών βακτηρίων έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών.(98) Οι β-λακταμάσες υδρολύουν το β-λακταμικό δακτύλιο με αποτέλεσμα να απενεργοποιούν το φάρμακο.

Στα Gram αρνητικά βακτήρια, οι β-λακταμάσες παράγονται και δρουν στον περιπλασμικό χώρο μεταξύ της εξωτερικής και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ στα Gram θετικά βακτήρια οι β-λακταμάσες είναι εξωένζυμα που διαχέονται στο περιβάλλον των βακτηρίων.(96)

Η πρώτη β-λακταμάση εντοπίστηκε πριν από την θεραπευτική χρήση της πενικιλίνης.(99,100) Εξελικτικά οι β-λακταμάσες πιθανά προέχονται από τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (το στόχο των β-λακταμικών αντιβιοτικών), με τις οποίες παρουσιάζουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες.(101)

Τα Gram αρνητικά βακτήρια παράγουν πολυάριθμες β-λακταμάσες, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα, αλλά και σε πλασμίδια.

## 4. Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ

Οι β-λακταμάσες είναι βακτηριακά ένζυμα που αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο στα Gram θετικά ενώ στα Gram αρνητικά εντοπίζονται κυρίως στον περιπλασμικό χώρο.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις β-λακταμάσες μπορούν να έχουν χρωμοσωμική ή πλασμιδιακή προέλευση. Οι β-λακταμάσες προϋπήρχαν της θεραπευτικής χρήσης των αντιβιοτικών. Θεωρείται ότι αναπτύχθηκαν για να προστατεύσουν τα βακτήρια από τα φυσικά β-λακταμικά παράγωγα στρεπτομυκήτων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών. Οι πλασμιδιακές β-λακταμάσες, φυλογενετικά προέρχονται από τις χρωμοσωματικές, αλλά τα γονίδιά τους φέρονται σε πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία. Θεωρείται ότι τα γονίδιά τους αποσπάστηκαν από διάφορα χρωμοσώματα και ενσωματώθηκαν σε κινητά στοιχεία (πλασμίδια, μεταθετά στοιχεία).

## 4.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

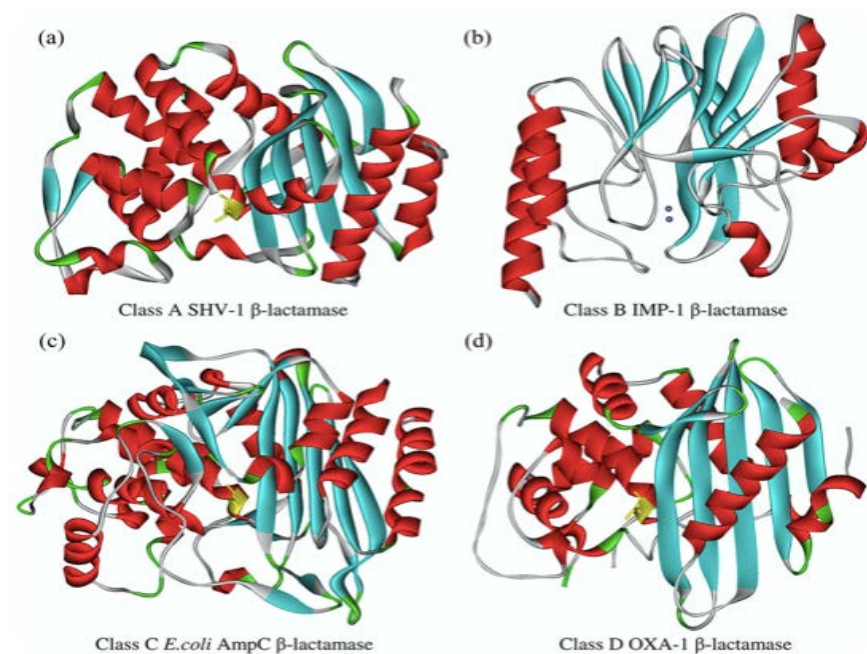
Οι β-λακταμάσες αδρανοποιούν τις β-λακτάμες υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό  $O=C-N$  του β-λακταμικού δακτυλίου. Στις περισσότερες β-λακταμάσες η υδρόλυση επιτυγχάνεται με αντίδραση ακυλίωσης μεταξύ του καρβονυλίου του β-λακταμικού δακτυλίου και του υδροξυλίου της σερίνης του ενεργού κέντρου. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εστέρα ο οποίος στη συνέχεια υδρολύεται. Το προϊόν υδρόλυσης του φαρμάκου είναι ανενεργό. Τα μεταλλοένζυμα αποτελούν μία μικρότερη κατηγορία β-λακταμασών με αυξανόμενη όμως κλινική σημασία. Ο μηχανισμός υδρόλυσης είναι διαφορετικός και απαιτεί την παρουσία ιόντων ψευδαργύρου.

Οι β-λακταμάσες χαρακτηρίζονται από σχετική ειδικότητα υποστρώματος καθώς το κάθε ένζυμο υδρολύει συνήθως μια μικρή ομάδα αντιβιοτικών.

## 4.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Η πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης των β-λακταμασών έγινε από τους Richmond και Sykes βάσει λειτουργικών κριτηρίων, όπως το φάσμα και ο ρυθμός υδρόλυσης των υποστρωμάτων, το μοριακό βάρος και το ισοηλεκτρικό σημείο των β-λακταμασών.(102) Από τότε έχουν προταθεί αρκετά σχήματα με επικρατέστερα: α) το δομικό σχήμα κατά Ambler (103) και β) το λειτουργικό σχήμα κατά Bush-Jacoby-Medeiros.(104)

Το πρώτο σχήμα ταξινόμησης με βάση την αλληλουχία και τη μοριακή δομή (μοριακή ταξινόμηση) προτάθηκε από τον Ambler το 1980. Η ταξινόμηση κατέληξε σε 4 μεγάλες ομάδες που συμβαδίζουν ικανοποιητικά με τη λειτουργική ταξινόμηση αλλά υστερούν στην ανάλυση της ενζυμικής δραστηριότητας. Οι ομάδες A, C και D περιλαμβάνουν τις β-λακταμάσες με σερίνη στο ενεργό κέντρο και η ομάδα B τα μεταλλοένζυμα με ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6.** Β-λακταμάσες (a) τάξης A SHV-1 (b) τάξης B IMP-1 (c) τάξης C AmpC (d) τάξης D OXA-1. Οι ενεργές θέσεις των β-λακταμασών με σερίνη έχουν κίτρινο χρώμα και τα ιόντα ψευδαργύρου εμφανίζονται ως γκρίζες σφαίρες.(105)

Με βάση τη λειτουργική ταξινόμηση που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Bush το 1988, οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε μεγάλες ομάδες (groups 1- 4) με πολλαπλές υποομάδες της ομάδας 2 που διαφοροποιούνται ανάλογα με το υπόστρωμα υδρόλυσης και την ευαισθησία στους αναστολείς. Σ' αυτή τη λειτουργική ταξινόμηση, οι καρβαπενεμάσες κατέχουν τις υποομάδες 2f, 2d και 3.

Το νεότερο σύστημα κατάταξης των β-λακταμασών κατά Bush, Jacoby και Medeiros (104) είναι στην ουσία βελτίωση του λειτουργικού συστήματος κατά Bush.

Ο Πίνακας 1 απεικονίζει μια διευρυμένη έκδοση του συστήματος λειτουργικής ταξινόμησης που προτάθηκε αρχικά από τον Bush το 1989 και επεκτάθηκε το 1995. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται τα σχήματα ταξινόμησης των β λακταμασών.(85)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZBa	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NIb	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- $\beta$ -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- $\beta$ -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or	OXA-23, OXA-48

						oxacillin and carbapenems	
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- $\beta$ -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

aCA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

bNI, not included.

### Πίνακας 1. Σχήματα ταξινόμησης $\beta$ -λακταμασών (85)

## 5. ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ

### 5.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Οι καρβαπενέμες προέρχονται από τις θιεναμυκίνες που είναι φυσικό προϊόν από τον μικροοργανισμό του εδάφους *Streptomyces cattleya*. Στην πραγματικότητα οι καρβαπενέμες και τα ολιβανικά οξέα αποτελούν τις πλέον φυσικές  $\beta$ -λακτάμες που αναγνωρίζονται σε διάφορες πηγές του περιβάλλοντος. Εξαιτίας της ύπαρξης αυτών των μορίων στο έδαφος, είναι αναμενόμενο ότι και τα ένζυμα που τα αποδομούν θα παράγονται από μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος, όπως *Bacillus cereus* και *Bacillus anthracis*, βακτήρια με καλά χαρακτηρισμένες μεταλλο- $\beta$ -λακταμάσες οι οποίες έδωσαν πλεονέκτημα στην ανάπτυξη και επιβίωση των στελεχών αυτών. Αυτές οι χρωμοσωμικές  $\beta$ -λακταμάσες εξελίχθηκαν αρχικά ως μηχανισμός προστασίας του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων, αλλά επιπρόσθετα συμμετείχαν στη ρύθμιση της σύνθεσής του. Ομοίως ανευρέθη SFC-1 (class A καρβαπενεμάση) σε περιβαλλοντικό στέλεχος *Serratia fonticola* (106), OXA-50 σε



*Pseudomonas aeruginosa* (107), OXA-51 σε *Acinetobacter baumannii* (108), OXA-62 σε *Pandoreae promemusa* (109) και OXA-54 σε *Shewanella spp* (110), ένζυμα τα οποία αποτελούν φυσικά παράγωγα του μικροβιακού γονιδιώματος. Το πρόβλημα της μετάδοσης της αντοχής στις καρβαπενέμες εντάθηκε όταν τα συγκεκριμένα γονίδια συνδέθηκαν με μεταθετά στοιχεία, όπως πλασμίδια και ιντεγκρόνια.

Αντιστρόφως, μεταλλοένζυμα τα οποία αρχικά απομονώθηκαν σε νοσοκομεία, τώρα ανευρίσκονται και σε περιβαλλοντικά βακτήρια. Παράδειγμα αποτελεί η VIM-2 καρβαπενεμάση η οποία ανιχνεύεται σε στέλεχος *Pseudomonas pseudoacaligenes* (111) σε νοσοκομειακό σύστημα διαχείρισης υδάτων, αλλά και η ανίχνευση IMI-2 καρβαπενεμάσης σε πλασμίδιο σπάνιων στελεχών *Enterobacter asburiae* (112) από ποτάμια των ΗΠΑ τα οποία δεν συσχετίζονται με κατοικημένες περιοχές.

Προφανώς η μετάδοση των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες συμβαίνει σε δύο κατευθύνσεις. Πηγές από το φυσικό περιβάλλον παρέχουν το γενετικό υλικό των ενζύμων, αλλά και κλινικά στελέχη διαχέουν τα σχετικά γονίδια ενδονοσοκομειακά ή στο φυσικό περιβάλλον.

## 5.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ -ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Μεταξύ των β-λακταμασών, η οικογένεια των καρβαπενεμασών περιλαμβάνει ένζυμα με την ισχυρότερη υδρολυτική δράση και το ευρύτερο φάσμα υποστρωμάτων.(113)

Οι καρβαπενεμάσες ανήκουν σε δύο κύριες μοριακές οικογένειες που διακρίνονται από τον υδρολυτικό μηχανισμό στο ενεργό κέντρο. Οι πρώτες καρβαπενεμάσες που περιγράφηκαν απομονώθηκαν από Gram θετικούς βάκιλλους. Σε αντίθεση με τις ως τότε γνωστές β-λακταμάσες, αυτά τα ένζυμα αναστέλλονταν από το EDTA και χαρακτηρίστηκαν ως μεταλλοένζυμα. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι όλες οι μεταλλοκαρβαπενεμάσες περιείχαν τουλάχιστον ένα κατιόν ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο που δρα ως συμπάροντας της ενζυμικής υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου.(114) Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 απομονώθηκαν από τα εντεροβακτηριακά καρβαπενεμάσες που δεν αναστέλλονταν από το EDTA (115,116), αλλά από τους άλλους β-λακταμικούς αναστολείς, την ταζομπακτάμη και το κλαβουλανικό οξύ. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούσαν σερίνη στο ενεργό κέντρο.(115,117)

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990, όλες οι καρβαπενεμάσες χαρακτηρίζονταν ως χρωμοσωμιακές, ειδικές για κάθε είδος, με πολύ συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Όμως η ανακάλυψη της πλασμιδικά μεταφερόμενης IMP-1 (καρβαπενεμάση τάξης B) σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* (118), της OXA-23 (καρβαπενεμάση τάξης D) σε στέλεχος

*Acinetobacter baumannii* (119,120) και του ενζύμου KPC-1 (καρβαπενεμάση τάξης A) σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* (121), άλλαξε την επικρατούσα άποψη για τον τρόπο διασποράς των αντίστοιχων γονιδίων.

Εντεροβακτηριακά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες έχουν αναφερθεί παγκοσμίως, κυρίως ως συνέπεια της ευρείας απόκτησης καρβαπενεμασών.(113) Μια μεγάλη ποικιλία καρβαπενεμασών που ανήκουν σε τρεις μοριακές κατηγορίες β-λακταμασών έχουν αναγνωριστεί στα Εντεροβακτηριακά: οι καρβαπενεμάσες τάξης A κατά Ambler, τάξης B και τάξης D (Πίνακας 2). Επιπλέον, σπάνιες κεφαλοσπορινάσες που κωδικοποιούνται από χρωμόσωμα (Ambler class C ή AmpC) που παράγονται από Εντεροβακτηριακά μπορεί να έχουν ελαφρά εκτεταμένη δράση έναντι των καρβαπενεμών, αλλά η κλινική τους σημασία παραμένει αμφισβητήσιμη.(113)

Ambler class	Name of the enzyme	Plasmid/ chromosome	Hydrolysis spectrum						Inhibitor
			Penicillins	First generation cephalosporins	Second generation cephalosporins	Third generation cephalosporins	Aztreonam	Carbapenems	
A	SME-1 to -3	Chromosome	++	++	–	+	+	+	Clavulanate, tazobactam, sulbactam, NXL-104
	NMC-A	Chromosome	++	++	–	+	–	++	
	IMI-2	Plasmid	++	++	–	+	–	++	
	GES-4, -5, -6	Plasmid	++	++	+	+	–	+	
	KPC-2 to -12	Plasmid	++	++	–	++	+	++	
B	IMP-1 to -33	Plasmid	++	++	++	++	–	++	EDTA
	VIM-1 to -33	Plasmid	++	++	++	++	–	++	
	NDM-1 to -6	Plasmid	++	++	++	++	–	+	
	KHM-1	Plasmid	++	++	++	++	–	++	
D	OXA-48	Plasmid	++	++	+/-	+/-	–	+	NaCl
	OXA-181	Plasmid	++	++	+/-	+/-	–	+	

The (+) or (++) annotations refer to the sole hydrolysis rate and do not take into account the level of carbapenem resistance observed in the corresponding bacterial host. Italicized inhibitors cannot be used in clinical practice. An annotation of (–) indicates, no detectable hydrolysis.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Βασικές καρβαπενεμάσες στα Εντεροβακτηριακά (122)

### 5.3 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ A

Τα ένζυμα αυτά ανήκουν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στη λειτουργική ομάδα 2f κατά Bush και φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο. Έχουν εμφανιστεί σποραδικά σε κλινικά στελέχη μετά από την πρώτη τους ανακάλυψη πριν από περισσότερα από 20 χρόνια.(116) Έχουν απομονωθεί είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές επιδημίες από στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Klebsiella spp.* (116,117,123) Χαρακτηρίζονται από μειωμένη ευαισθησία στην μιπενέμη, αλλά οι MICs ποικίλλουν από ελαφρώς αυξημένη ανθεκτικότητα έως πλήρους αντοχής, γι'αυτό και συχνά μπορεί να μην αναγνωριστούν μετά

από συνήθη τεστ ευαισθησίας. Υδρολύουν καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες και αζτρεονάμη και αναστέλλονται από κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη.

### 5.3.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ A

Η **SME-1** (*Serratia Marcescens* Enzyme) ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Αγγλία καθώς απομονώθηκε από στελέχη *S. marcescens* το 1982.(117,124) Η SME-1 μαζί με τις σχεδόν πανομοιότυπες **SME-2** και **SME-3** έχουν βρεθεί σποραδικά στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.(125–128)

Οι **IMI-1**, **IMI-2** (Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase) και η **NMC-A** (Non Metallo-enzyme Carbapenemase) ανιχνεύτηκαν αρχικά σε στελέχη *Enterobacter cloacae* σε ΗΠΑ, Γαλλία και Αργεντινή.(115,123,129,130) Είναι χρωμοσωμικά ένζυμα αλλά υπάρχουν μεμονωμένες περιπτώσεις απομόνωσης πλασμιδιακής IMI-2 σε στελέχη *Enterobacter asburiae* σε ποτάμια στις ΗΠΑ και *Enterobacter cloacae* στην Κίνα.(131,132)

### 5.3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ A

Οι **KPC 1-2-3-4 έως 12** (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) βρίσκονται κυρίως στην *K. Pneumoniae* αλλά έχει αναφερθεί ότι βρέθηκαν σε *Enterobacter spp.* και σε *Salmonella spp.*(133–135) Η KPC-1 ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 1996 στις ΗΠΑ σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* (121) και οι KPC-2 το 2003 ως αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στην KPC-1 και εμφανίστηκε στη Βαλτιμόρη από το 1998 έως το 1999. Το γονίδιο παραγωγής KPC-2 βρισκόταν σε ένα πλασμίδιο και σημειώθηκε ότι ενώ όλα τα στελέχη εμφάνιζαν μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη κανένα δεν ήταν ανθεκτικό.(134)

Ταυτόχρονα με τις αυξανόμενες αναφορές της KPC-2, μια παραλλαγή ενός αμινοξέος της KPC-2, η KPC-3, αναφέρθηκε από το 2000 έως το 2001 σε *Klebsiella pneumoniae* στη Νέα Υόρκη.(136) Το KPC-3 έχει επίσης ανιχνευθεί σε *Enterobacter spp* όπου οι MICs για την ιμιπενέμη δεν ήταν στο εύρος αντοχής.(133)

Μετά από την ευρεία επικράτηση των KPC στην αμερικανική ήπειρο, πολύ σύντομα επεκτάθηκαν στη Γαλλία (137), στην Κολομβία (138), στο Ισραήλ (139) και στην Κίνα (140). Διαθέτουν τη μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς σε σχέση με άλλες καρβαπενεμάσες και τα στελέχη που τις παράγουν ενδημούν κυρίως σε νοσοκομειακό περιβάλλον. Συχνά είναι

πολυανθεκτικά υδρολύοντας αποτελεσματικά πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και καρβαπενέμες αφήνοντας περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και υψηλά ποσοστά θνητότητας.(141)

Η **GES/IBC** (Guiana Extended Spectrum/Integron-Borne Cephalosporinase) ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 2000 σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Ελλάδα (142) και σε στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* στη Γαλλική Γουιάνα (143). Τα συγκεκριμένα γονίδια που εδράζονταν σε ιντεγκρόνια σε πλασμίδια, εξαπλώθηκαν παγκοσμίως και σχετίζονται με μεμονωμένα περιστατικά. Ωστόσο, στελέχη *P. aeruginosa* που εκφράζουν GES-2 έχουν προκαλέσει μία μικρή έξαρση σε νοσοκομείο σε οκτώ ασθενείς (144) και έξι ασθενείς στην Κορέα είχαν λοιμώξεις που προκλήθηκαν από *K. pneumoniae* που παράγει GES-5 (145).

## 5.4 ΜΕΤΑΛΛΟ-Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ B (MBL)

Αυτή η κατηγορία των β-λακταμασών που ανήκει στην ομάδα 3 κατά Bush χαρακτηρίζεται από την ικανότητα υδρόλυσης όλων των β-λακταμικών πλην της αζτρεονάμης. Ο μηχανισμός της υδρόλυσης εξαρτάται από την αλληλεπίδραση υποστρώματος με τα κατιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου προσδίδοντας έτσι το τυπικό χαρακτηριστικό της αναστολής από το EDTA (χηλικός παράγοντας δέσμευσης του Zn). Το κλαβουλανικό οξύ και η ταζομπακτάμη είναι αδρανή κατά των μεταλλο-β-λακταμασών.(146,147)

### 5.4.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ B

Οι πρώτες μεταλλο-β-λακταμάσες που ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν αποτελούσαν χρωμοσωμικά ένζυμα σε περιβαλλοντικά και ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια, όπως *Bacillus cereus* (148,149), *Aeromonas spp.* (150) και *Stenotrophomonas maltophilia* (151), τα οποία εξέφραζαν τουλάχιστον μία β-λακταμάση με σερίνη στο ενεργό κέντρο μαζί και με τις δύο επαγωγίμες β-λακταμάσες μετά από έκθεση σε β-λακταμικά. Η πρώτη μεταλλο-β-λακταμάση στην οποία έγινε νουκλεοτιδική αλληλούχιση ήταν η BCII που απομονώθηκε από στέλεχος *Bacillus cereus* και η οποία αποτέλεσε την πρωτότυπη μεταλλο-β-λακταμάση για πολλά χρόνια. Εκτεταμένος μοριακός χαρακτηρισμός έγινε στην Ccra χρωμοσωμική μεταλλο-β-λακταμάση που απομονώθηκε από στελέχη *Bacteroides fragilis*.(152,153) Ευτυχώς, με εξαίρεση τη *S. maltophilia*, αυτά τα βακτήρια δεν έχουν συσχετιστεί συχνά με σοβαρές

νοσοκομειακές λοιμώξεις, καθώς είναι γενικά ευκαιριακά παθογόνα και τα χρωμοσωμικά γονίδια μεταλλο-β-λακταμάσης δεν μεταφέρονται εύκολα.(113)

#### 5.4.2 ΕΠΙΚΤΗΤΕΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ Β

Σε αντίθεση με τις ιδιοσυστασιακές χρωμοσωμικές μεταλλο-β-λακταμάσες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τα τελευταία χρόνια σημειώθηκε ραγδαία αύξηση στην ανίχνευση και εξάπλωση των επίκτητων ή μεταφερόμενων μεταλλοενζύμων σε στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* και *Enterobacteriaceae*. Τα μεταλλοένζυμα ενσωματώνονται σε γονιδιακές κασσέτες, κυρίως σε ιντεγκρόνια τύπου 1. Όταν τα ιντεγκρόνια σχετίζονται με πλασμίδια ή τρανσποζόνια είναι προφανές ότι η μεταφορά των μεταλλοενζύμων μεταξύ των μικροβίων καθίσταται ιδιαίτερα ευχερής. Οι παγκοσμίως καταγεγραμμένοι τύποι είναι οι **IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, KHM, AIM** και **DIM**, εκ των οποίων οι πλέον σημαντικοί λόγω ευρείας διασποράς στα μικρόβια της νοσοκομειακής χλωρίδας είναι οι IMP, VIM, SPM και NDM τύποι.

Μεταφερόμενη αντοχή στην ιμιπενέμη εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία σε *P. aeruginosa* που απομονώθηκε το 1990 (118), ακολουθούμενη από μια δεύτερη αναφορά μιας μεταφερόμενης καρβαπενεμάσης στο *B. fragilis* (154). Το μεταβιβάσιμο ένζυμο του *B. fragilis* ήταν ένα από τα πρώτα χαρακτηρισμένα ως μεταλλο-β-λακταμάση. Αυτό το είδος δεν έχει προκαλέσει εκτεταμένα κλινικά ξεσπάσματα στην Ιαπωνία. Η **IMP-1** (ιμιπενεμάση) απομονώθηκε σε συζευγμένο πλασμίδιο στελέχους *Pseudomonas aeruginosa* (155) και στη συνέχεια σε ιντεγκρόνιο στελέχους *S. marcescens* και άλλων εντεροβακτηριακών στην Ιαπωνία (93,156–158). Αυτό το ένζυμο υδρόλυε την ιμιπενέμη, τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος αλλά όχι την αζτρεονάμη. Η υδρολυτική δραστηριότητα αναστέλλονταν από το EDTA και αποκαθίστατο με την προσθήκη κατιόντων ψευδαργύρου. Το πρώτο μέλος της οικογένειας IMP που βρέθηκε στην Ευρώπη ήταν σε στέλαχος *A. baumannii* στην Ιταλία το οποίο παρήγαγε το ένζυμο IMP-2 ως την πρώτη κασέτα σε ένα ιντεγκρόνιο κατηγορίας 1.(159) Έκτοτε η ομάδα IMP εξαπλώθηκε παγκοσμίως και ιδιαίτερα σε ΗΠΑ και Αυστραλία.(160,161) Εκτός από τα προαναφερθέντα στελέχη, το blaIMP-1 γονίδιο έχει απομονωθεί και σε άλλα στελέχη όπως *Brevieum diminuta*, *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosohdans*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fluorescens* υποδηλώνοντας την οριζόντια διασπορά του γονιδίου όχι μόνο μεταξύ στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και *S. marcescens*, αλλά και τη μεταφορά του από την κοινότητα στο νοσοκομείο.(162)

Η **SPM** (Sao Paolo Metallo-β-lactamase) ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* στο Σάο Πάολο στη Βραζιλία. Από την αρχική αναφορά μεμονωμένοι κλώνοι *P. aeruginosa* που περιέχει SPM-1 έχουν προκαλέσει πολλαπλά νοσοκομειακά ξεσπάσματα με υψηλή θνησιμότητα στη Βραζιλία.(163–165)

Η **GIM-1** (German Imipenemase) απομονώθηκε στη Γερμανία το 2002 (166) σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* από ιντεγκρόνιο τάξης 1 σε πλασμίδιο. Η GIM είχε περίπου 30% ομολογία με VIM, 43% ομολογία με IMPs και 29% ομολογία με SPM.

Η **SIM** (Seoul Imipenemase) απομονώθηκε από στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter spp.* στη Σεούλ της Κορέας.(167)

Η **VIM -1** (Verona Integron encoded Metallo-β-lactamase) απομονώθηκε το 1997 στη Βερόνα της Ιταλίας (91) και η **VIM-2** το 1996 στη Γαλλία (168) και τα δύο από ιντεγκρόνια τάξης 1 στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*. Το κλινικό αυτό στέλεχος παρουσίαζε αντοχή στα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένης της μιπενέμης και αναστελλόταν από το EDTA. Το φάσμα υποστρωμάτων της VIM-1 είναι τυπικό της τάξης B κατά Ambler, συμπεριλαμβάνοντας τα περισσότερα β-λακταμικά πλην της αζτρεονάμης.

Έκτοτε, η VIM-1 έχει βρεθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. putida*, *Acinetobacter spp*, *P. stutzeri*, *C. freundii*, *E. coli* και *P. mirabilis* σε πολλές χώρες όπως μεταξύ άλλων στη Γαλλία, στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Κορέα, στην Ταϊβάν, στην Πορτογαλία, στην Πολωνία, στις ΗΠΑ, στην Κροατία, στο Βέλγιο, και σε χώρες της Νότιας Αμερικής.(91,169–176) Έως σήμερα η οικογένεια των VIM ενζύμων αριθμεί περισσότερα από 30 μέλη, με τα VIM-1 και VIM-2 να είναι τα πλέον διαδεδομένα παγκοσμίως.

Μετά την αρχική τους ανακάλυψη, οι μεταλλο-β-λακταμάσες SPM, GIM και SIM δεν έχουν εξαπλωθεί πέρα από τις χώρες προέλευσής τους. Ωστόσο, οι VIM και IMP συνεχίζουν να ανιχνεύονται σε όλο τον κόσμο, σε στελέχη *P. aeruginosa* και στα Εντεροβακτηριακά.(113)

Η **NDM-1** (New Delhi Metallo-β-lactamase) είναι η τελευταία σημαντική οικογένεια επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών και περιγράφηκε το 2008 στη Σουηδία σε απομονωθέν εντεροβακτηριακό στέλεχος Ινδού ασθενούς που προηγουμένως είχε νοσηλευτεί στο Νέο Δελχί (177), αποτελώντας το νέο επίκεντρο της παγκόσμιας προσοχής. Έκτοτε τα NDM-1 μεταλλοένζυμα έχουν απομονωθεί σε όλες τις ηπείρους με μόνη εξαίρεση την Κεντρική και Νότιο Αμερική με άμεση σύνδεση στις περισσότερες περιπτώσεις με την ινδική υποήπειρο (178). Λίγα κρούσματα έχουν αναφερθεί από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και τον Καναδά (178). Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα βαλκανικά κράτη και η Μέση Ανατολή μπορεί να λειτουργήσουν ως δευτερεύουσες δεξαμενές των NDM-1 (178). Σε αντίθεση με πολλά άλλα γονίδια καρβαπενεμάσης, το γονίδιο bla<sub>NDM-1</sub> δεν σχετίζεται με έναν μόνο κλώνο, αλλά μάλλον με μη κλωνικές απομονώσεις και είδη (178,179). Έχει εντοπιστεί

κυρίως σε *E. coli* και *K. pneumoniae* και σε μικρότερο βαθμό σε άλλα εντεροβακτηριακά είδη (178,179). Το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες ποικίλλει και τα πλασμίδια που τα περιέχουν μεταφέρουν και άλλα ένζυμα αντοχής στα αντιβιοτικά (OXA-48, VIM, ESBL, κεφαλοσπορίναση, γονίδια αντοχής σε αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, ριφαμπικίνη, σουλφαμεθοξαζόλη) (178,179). Ορισμένα στελέχη είναι ευαίσθητα σε τιγκεκυκλίνη, κολιστίνη και σε μικρότερο βαθμό στη φωσφομυκίνη. Ανησυχία προκαλεί η ευρεία διάδοσή τους σε νοσοκομειακά στελέχη όπως *Klebsiella pneumoniae*, σε στελέχη της κοινότητας όπως *E. coli*, αλλά και στο φυσικό περιβάλλον.(180)

Οι τελευταίες κατηγορίες που έχουν περιγραφεί, **KHM** (Ιαπωνία), **AIM** (Αυστραλία) και **DIM** (Ολλανδία) παρουσιάζουν χαμηλότερο βαθμό διασποράς και λιγότερη κλινική σημασία σε σχέση με τα NDM ένζυμα.

## 5.5 ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ ΤΑΞΗΣ D

Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στη λειτουργική ομάδα 2d κατά Bush και φέρουν σερίνη στο ενεργό κέντρο τους. Αναφέρονται και ως **OXA** (oxacillin-hydrolysing) β-λακταμάσες και αποτέλεσαν τις κυριότερες πλασμιδιακές β-λακταμάσες στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980.(181–183) Είχαν ταυτοποιηθεί κυρίως στα Εντεροβακτηριακά και σε *P. aeruginosa* και λειτουργικά περιγράφηκαν ως πενικιλινάσες ικανές να υδρολύουν την οξακιλλίνη και την κλοξακιλλίνη (184–186). Γενικά αναστέλλονταν ελάχιστα από το κλαβουλανικό οξύ και το EDTA και είναι γνωστό ότι έχουν μεγάλη μεταβλητότητα στις αλληλουχίες αμινοξέων.(104)

Η πρώτη λακταμάση OXA με δράση καρβαπενεμάσης περιγράφηκε το 1993. Το ένζυμο απομονώθηκε από ένα πολυανθεκτικό στέλεχος *A. baumannii* το 1985 από έναν ασθενή στο Εδιμβούργο της Σκωτίας.(119)

Το φάσμα υδρόλυσης τους ποικίλλει. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, αλλά ελάχιστα έως καθόλου τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη. Έχουν χαμηλότερη υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών σε σχέση με τα μεταλλοένζυμα. Ωστόσο σε κλινικά στελέχη παρουσιάζεται υψηλή αντοχή λόγω της συχνής συνύπαρξης άλλων μηχανισμών.

Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 102 διακριτές OXA β-λακταμάσες. Από αυτές, οι 9 αποτελούν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες και τουλάχιστον 37 θεωρούνται καρβαπενεμάσες. Οι OXA καρβαπενεμάσες αποτελούν τον βασικότερο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες

στο είδος *A. baumannii*. Έχουν ανιχνευτεί επίσης σε στελέχη *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Η **OXA-48** βρέθηκε πρώτα σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που απομονώθηκε στην Τουρκία το 2003.(95) Στην Τουρκία αποτέλεσε πηγή νοσοκομειακών εξάρσεων.(187–191) Η παγκόσμια κατανομή της περιλαμβάνει χώρες στην Ευρώπη, στο νότιο και ανατολικό τμήμα της Μεσογείου Θάλασσας και στην Αφρική.(95,187–191)

Η OXA-48 δεν έχει αναφερθεί από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και τον Καναδά. Μία παραλλαγή της OXA-48, η **OXA-181**, με παρόμοια δράση καρβαπενεμάσης έχει ταυτοποιηθεί σε στελέχη από την Ινδία.(192,193) Έχει βρεθεί επίσης σε χώρες όπως η Γαλλία, η Γερμανία, η Ισπανία, η Ολλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο.

Τα OXA-48/OXA-181 υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες και τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος, όπως η κεφταζιδίμη και η αζτρεονάμη.(95,192) Δεν αναστέλλονται από το EDTA ή το κλαβουλανικό οξύ. Αν και αναφέρεται σε διάφορα εντεροβακτηριακά είδη, η OXA-48 εντοπίζεται κυρίως σε *K. pneumoniae* και *E. coli*, και το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες είναι συνήθως υψηλότερο όταν σχετίζεται με παρουσία ESBL και διαταραχή διαπερατότητας.(187–193)

## **5.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ (CRE)**

Η παγκόσμια εμφάνιση βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάση ικανά να υδρολύσουν τα άλλοτε αποτελεσματικά αντιβιοτικά, τις καρβαπενέμες, θεωρείται ένα σύγχρονο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία. Τα ένζυμα καρβαπενεμάσης, που κάποτε περιορίζονταν σε απομονώσεις από την *Klebsiella pneumoniae*, αναφέρονται πλέον σε διάφορα βακτήρια της τάξης των Εντεροβακτηριακών, δημιουργώντας το ακρωνύμιο CRE (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*) που ορίζει τώρα τα Ανθεκτικά στις Καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακά. Τα CRE που φιλοξενούν διαφορετικούς τύπους ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των πιο διαδεδομένων τύπων KPC, VIM, IMP, NDM και OXA-48, αναφέρονται πλέον τακτικά και είναι συχνά παρόντα σε πολλές λοιμώξεις παγκοσμίως.

Πριν από πάνω από μια δεκαετία, το ακρωνύμιο ESKAPE pathogens χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα ονόματα έξι βακτηριακών παθογόνων (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A.baumannii*, *P. aeruginosa* και *Enterobacter spp.*) που σχετίζονται με φθίνουσες κλινικές αποκρίσεις και αυξανόμενα ποσοστά αντιμικροβιακής αντοχής.(194) Από αυτή την αρχική περιγραφή και την έκκληση για αναγνώριση χρηματοδότησης για την υποστήριξη της



ανάπτυξης αντιβιοτικών, η παγκόσμια επέκταση της αντοχής στην καρβαπενέμη μεταξύ των Gram αρνητικών βακτηρίων έχει αυξηθεί σταθερά, ωθώντας τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) να εκφράσουν ανησυχίες σχετικά με την αντοχή στα αντιβιοτικά και να την χαρακτηρίσουν ως μια επείγουσα απειλή για τη δημόσια υγεία.(195)

Μεγάλο μέρος της αύξησης των CRE πιθανότατα σχετίζεται με την εμφάνιση και την εξάπλωση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις καρβαπενεμάσες. Στις ΗΠΑ, η πιο συχνά αναγνωρισμένη καρβαπενεμάση είναι η καρβαπενεμάση KPC. Αυτό το ένζυμο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2001 όταν απομονώθηκε από έναν ασθενή στη Βόρεια Καρολίνα.(121) Περιπτώσεις που αφορούν οργανισμούς που φέρουν γονίδια KPC έχουν περιγραφεί από κάθε πολιτεία των ΗΠΑ καθώς και άλλες καρβαπενεμάσες που παράγονται από Εντεροβακτηριακά συμπεριλαμβανομένων των NDM, VIM, IMP και OXA-48 έχουν αναφερθεί σε ασθενείς που νοσηλεύονται στις ΗΠΑ. Τα CRE που παράγουν μια καρβαπενεμάση διαφορετική από την KPC είναι γενικά ασυνήθιστα στις ΗΠΑ και συχνά σχετίζονται με εκθέσεις υγειονομικής περίθαλψης εκτός των ΗΠΑ. Ωστόσο, πρόσφατες αναφορές υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς μπορεί να αποικίζονται με (CR) μικροοργανισμούς χωρίς παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου όπως ταξίδια στο εξωτερικό.(196)

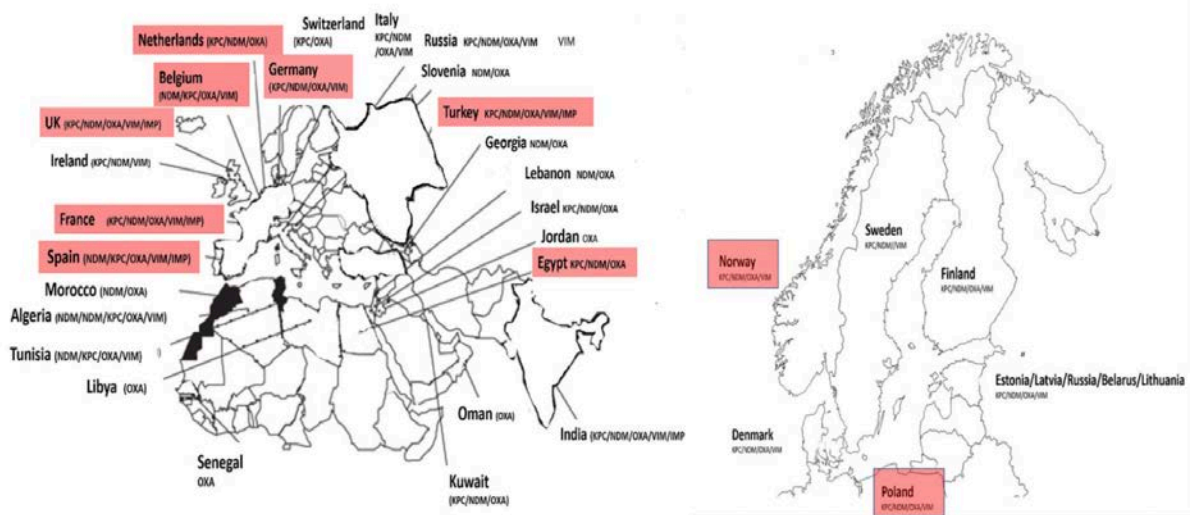
Ως απάντηση στις ανησυχίες σχετικά με την αντοχή στα αντιβιοτικά το CDC εγκαινίασε το Εθνικό Δίκτυο Ασφάλειας Υγείας (NHSN), ένα σύστημα που χρησιμοποιείται για την επιτήρηση της αντοχής στα αντιβιοτικά στις ΗΠΑ. Το 2006-2007 το NHSN ανέφερε ότι τα ποσοστά αντοχής στην καρβαπενέμη για την *E. coli* και την *K. pneumoniae* σε λοιμώξεις του αίματος που σχετίζονται με την κεντρική γραμμή (CLABSIs-Central line-associated bloodstream infections) ήταν 0,9% και 10,8%, αντίστοιχα.(197) Δύο χρόνια αργότερα τα δεδομένα του NHSN για τα έτη 2009-2010 έδειξαν ότι τα ποσοστά αντοχής στην καρβαπενέμη για τις λοιμώξεις CLABSIs σε όλα τα δοκιμασμένα στελέχη είχαν διπλασιαστεί στο 2% για το *E. coli* και για την *K. pneumoniae* αυξήθηκαν στο 12,8%.(198) Μέχρι το 2014 η αντοχή στην καρβαπενέμη στις λοιμώξεις CLABSIs ανιχνεύθηκε εύκολα μεταξύ των *Klebsiella pneumoniae/oxytoca* (9%), *E. coli* (1,9%), *Enterobacter spp.* (6,6%), *P. aeruginosa* (25,8%) και *Acinetobacter spp.* 46,6%).(199)

Η συχνότητα εμφάνισης CRE αυξάνεται παγκοσμίως. Σε μία μελέτη αξιολογήθηκαν τα ποσοστά αντοχής στην καρβαπενέμη για τα *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* και *A. baumannii* σε 9 περιοχές των ΗΠΑ χρησιμοποιώντας δεδομένα από την Premiere Health Database από το 2009 έως το 2013 και βρέθηκε ότι το συνολικό ποσοστό αντοχής στην καρβαπενέμη μεταξύ των 4 αυτών παθογόνων ήταν 4,5% από 292.742 απομονώσεις που εξετάστηκαν.(200)

Η πρόσβαση στα παγκόσμια ταξίδια έχει αναμφισβήτητα οδηγήσει στη διάδοση της αντοχής στα αντιβιοτικά σε πολλές χώρες.(201) Η πρώτη καρβαπενεμάση αναφέρθηκε στην Ιαπωνία

και απομονώθηκε από *Aeromonas hydrophila* τη δεκαετία του 1980. Ακολούθησαν αναφορές που περιγράφουν την μιπενεμάση της Σεούλ (SME-1) από *Serratia marcescens*, μιπενεμάσες (IMI-1) στην Καλιφόρνια (1984) και NMC-A στη Γαλλία (1990) και τα δύο από το *Enterobacter cloacae*.(202)

Παγκοσμίως τα κλινικά χαρακτηριστικά των ανθεκτικών στην καρβαπενέμη μικροοργανισμών ποικίλλουν ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες και τις γεωγραφικές περιοχές. Χώρες όπως το Ισραήλ, η Ελλάδα και η Κολομβία έχουν αναφέρει σημαντικές εστίες λοιμώξεων που σχετίζονται με CRE.(203) Κανένα σενάριο δεν αντικατοπτρίζει καλύτερα τις ανησυχίες γύρω από την εξάπλωση των ανθεκτικών στην καρβαπενέμη Gram αρνητικών βακτηρίων από την εμπειρία της Ελλάδας η οποία έχει τώρα μερικά από τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής στην καρβαπενέμη. Πριν από το 2001 το Ελληνικό Σύστημα Επιτήρησης της Αντιμικροβιακής Αντοχής ανέφερε επικράτηση ανθεκτικότητας στην καρβαπενέμη <1% και η αντοχή CRE αποδιδόταν σε μεγάλο βαθμό στο MBL τύπου VIM-1. Το 2008 η CRE στην Ελλάδα είχε αυξηθεί δραματικά στο 30% στους θαλάμους νοσοκομείων και στο 60% στις ΜΕΘ.(204) Μέχρι το 2014 το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων EARS-Net αποκάλυψε ότι το 62,3% όλων των απομονώσεων *K. pneumoniae* που δοκιμάστηκαν στην Ελλάδα ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες.(204) Αυτή η εξάπλωση στην Ελλάδα οφείλεται στην εισαγωγή του γονιδίου blaKPC-2 που εξαπλώθηκε σε όλη τη χώρα το 2007. Προς το τέλος του επόμενου έτους (2008), η επιτήρηση 21 ελληνικών νοσοκομείων αποκάλυψε ότι το 96% της ανθεκτικής στην καρβαπενέμη *K. pneumoniae* θα μπορούσε να αποδοθεί σε έναν μοναδικό τύπο αλληλουχίας (ST258 lineage) της *K. pneumoniae* που φιλοξενεί το γονίδιο blaKPC-2. Η διάδοση των γονιδίων καρβαπενεμάσης και το ξέσπασμα λοιμώξεων από CRE στην Ευρώπη φαίνονται στην Εικόνα 7.



**EIKONA 7.** Χώρες στις οποίες έχουν περιγραφεί γονίδια καρβαπενεμάσης. Οι χώρες που εμφανίζονται στα κόκκινα πλαίσια αντιπροσωπεύουν περιπτώσεις στις οποίες έχουν περιγραφεί εστίες όπου εμφανίστηκαν γονίδια καρβαπενεμάσης.(205)

Μετά την παγκόσμια εξάπλωση του στελέχους ST258 της *K. Pneumoniae* συμπεριλαμβανομένων και των ΗΠΑ χρησιμοποιήθηκε η multi-locus sequence typing (MLST) για την παρακολούθηση της παγκόσμιας επιδημιολογίας των CRE και της διάδοσης των γονιδίων KPC. Το στέλεχος ST258 συνεχίζει να υπάρχει ως κυρίαρχο παγκόσμιο στέλεχος το οποίο έχει συσχετιστεί με εστίες στην Πολωνία, την Κολομβία και τις Ηνωμένες Πολιτείες και είναι υπεύθυνο για το 90% όλων των μολύνσεων από *K. pneumoniae* στο Ισραήλ.(206)

Οι παραλλαγές του γονιδίου KPC είναι οι πιο συχνά απαντώμενες παγκοσμίως καρβαπενεμάσες με τις παραλλαγές των γονιδίων bla<sub>KPC-2</sub> και bla<sub>KPC-3</sub> να είναι οι πιο κοινές. Οι χώρες με υψηλό επιπολασμό *K. pneumoniae* που παράγει KPC περιλαμβάνουν τις ΗΠΑ, την Ευρώπη (Ιταλία, Ελλάδα), το Ηνωμένο Βασίλειο και την Ασία (Κίνα), καθώς και ορισμένες χώρες στη Μέση Ανατολή (Ισραήλ) και τη Νότια Αμερική (Βραζιλία, Κολομβία).(203)

Η πρώτη αναγνώριση μιας *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48 συνέβη ως μέρος μιας αναφερόμενης έξαρσης από το Μάιο του 2006 έως τον Ιανουάριο του 2007.(207) Τα επόμενα χρόνια οι μικροοργανισμοί που παράγουν OXA-48 παρέμειναν σε μεγάλο βαθμό περιορισμένοι στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης στην Τουρκία.(207) Μετά από αυτές τις αρχικές αναφορές τα κρούσματα εξαπλώθηκαν από την Τουρκία σε χώρες της Μέσης Ανατολής (Λίβανος, Ομάν, Σαουδική Αραβία και Κουβέιτ), καθώς και σε χώρες της Βόρειας Αφρικής (Μαρόκο, Τυνησία, Αίγυπτος, και Λιβύη). Ενώ τα βακτήρια που φέρουν το γονίδιο OXA-48 αρχικά περιορίζονταν γεωγραφικά στις περιοχές γύρω από την Τουρκία, έχουν πλέον περιγραφεί σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες όπως Γαλλία, Γερμανία, Ολλανδία, Ιταλία, Βέλγιο, Ηνωμένο Βασίλειο, Ιρλανδία, Σλοβενία, Ελβετία και Ισπανία. Η πρώτη περιγραφή απομόνωσης μικροοργανισμών με γονίδια τύπου OXA-48 στις ΗΠΑ προήλθε από μια μελέτη επιτήρησης το 2013 η οποία ανέφερε 2 απομονώσεις *K. pneumoniae*.(208) Αυτή η περιγραφή ακολουθήθηκε λίγο αργότερα από μια αναφορά 2 κλινικών απομονώσεων *K. pneumoniae* με γονίδια που μοιάζουν με bla<sub>OXA-48</sub> σε ασθενείς σε ίδρυμα της Βιρτζίνια που είχαν ταξιδέψει τόσο στην Ινδία όσο και στη Σαουδική Αραβία.(209) Η ταχεία διάδοση των μικροοργανισμών που παράγουν OXA-48 μεταξύ των Εντεροβακτηριακών εκτός από την *K. pneumoniae*, συμπεριλαμβάνει τα *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *K. oxytoca*, *Serratia marcescens* και *Providencia rettgeri* και υποδηλώνει ότι η κλινική σημασία του OXA-48 στην αντίσταση στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι πιο σημαντική από ό,τι είχε αρχικά αντιληφθεί. Το ένζυμο OXA-48 υδρολύει αποτελεσματικά τις πενικιλίνες, τις καρβαπενέμες

αργά και τις κεφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος πτωχά, με αποτέλεσμα συχνά ποικίλα πρότυπα αντοχής στα αντιβιοτικά.

Έχει τεκμηριωθεί ότι οι περιβαλλοντικοί φορείς παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της αντοχής στις καρβαπενέμες. Υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις στις ΗΠΑ για περιπτώματα άγριων πτηνών (γλάρων) που φιλοξενούν πλασμιδιακά κωδικοποιημένα γονίδια bla<sub>KPC-2</sub> και χρωμοσωμικά κωδικοποιημένα γονίδια bla<sub>OXA-48</sub>.(210) Μια πρόσφατη αναφορά που συνδέει τα CRE με τα ζώα συνεχίζει να ενημερώνει την επιδημιολογία της αντοχής στην καρβαπενέμη. Οι Kock et al. (211) περιγράφουν τον συνολικό επιπολασμό των CRE στο < 1% μεταξύ των ζώων και των ζώων συντροφιάς στην Ευρώπη, αλλά τα CRE μπορεί επίσης να βρεθούν σε ζώα με επιπολασμό 2–26% στην Αφρική και 1–15% στην Ασία. Ενώ τα άγρια πτηνά (γλάροι) στην Αυστραλία και την Ευρώπη έφεραν CRE σε ποσοστό 16-19% (211), υποδεικνύοντας ότι η μετάδοση των CRE μεταξύ ζώων και ανθρώπων μπορεί να είναι μια άγνωστη δεξαμενή και τα πουλιά μπορεί να γίνουν φορέας για τη μετάδοση του CRE, περαιτέρω έρευνα που να συνδέει τη μετάδοση τους από τα ζώα στον άνθρωπο είναι απαραίτητη. Περιβαλλοντικές πηγές καρβαπενεμασών που συνδέονται με ύδατα αναψυχής και λύματα έχουν επίσης αναφερθεί ως δεξαμενές για τα CRE.(212) Οι Mahon et al. (212) εντόπισαν *E. coli* και *K. pneumoniae* που παράγουν NDM σε νερά αναψυχής και υπονόμους στην Ιρλανδία.

Οι Mani et al. (213) βρήκαν Εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC στο *Mytilus galloprovincialis* (ένα μεσογειακό μύδι που τρέφεται με φίλτρο) που αγοράστηκε σε μια αγορά λιανικής στην Τυνησία. Η *E. coli* που απομονώθηκε περιείχε γονίδια bla<sub>KPC</sub> και ήταν ανθεκτική σε όλες τις β-λακτάμες, σε ερταπενέμη, μεροπενέμη, φλουοροκινολόνες, σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη. Το προϊόν απομόνωσης είναι πιθανότατα ανθρώπινης προέλευσης καθώς τα μύδια που ελήφθησαν δειγματοληπτικά αναπτύχθηκαν σε περιοχή υποδοχής νοσοκομειακών λυμάτων. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από την παγκόσμια επιδημιολογία των πλασμιδίων bla<sub>KPC</sub> και των κλώνων *E. coli* που παράγουν KPC καθώς οι καρβαπενέμες δεν χρησιμοποιούνται σε ζώα.(213) *K. pneumoniae* που παράγει KPC έχει επίσης αναφερθεί από λύματα στην Αυστρία και τη Βραζιλία.(214) Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι υδρόβιοι οργανισμοί μπορεί να λειτουργούν ως δευτερεύουσα δεξαμενή ενζύμων KPC.

Η *K. pneumoniae* που φέρει τις καρβαπενεμάσες τύπου VIM εντοπίστηκε για πρώτη φορά στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2010.(215) Τα στελέχη που κωδικοποιούν VIM καρβαπενεμάσες είναι ενδημικά στην Ελλάδα και την Ιταλία και οι λοιμώξεις στις Ηνωμένες Πολιτείες σχετίζονται με ταξίδια και νοσηλεία σε αυτές τις χώρες.(90,91,208) Οι λοιμώξεις από στελέχη που παράγουν MBL συχνά συνδέονται με ταξίδια και νοσηλεία σε ενδημικές περιοχές.(90) Τέλος τα MBL τύπου ιμπενεμάσης (IMP) είναι ενδημικά στην Ιαπωνία (216), αλλά έχουν ανιχνευθεί παγκοσμίως (217).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) όπου μελετήθηκαν συνολικά 45 στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, τα οποία εμφάνιζαν αντοχή στις καρβαπενέμες. Τα 45 αυτά στελέχη επιλέχθηκαν τυχαία σε ένα διάστημα περίπου ενός μήνα (31/03/2021-05/05/2021) και ελέγχθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*. Βρέθηκε ότι τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκουν σε έξι διαφορετικές κατηγορίες ως προς την αντοχή στις καρβαπενέμες, δηλαδή είναι KPC θετικά ή KPC και VIM ή KPC και NDM ή NDM ή NDM και OXA-48 ή OXA-48. Έξι θετικά δείγματα από κάθε κατηγορία χαρακτηρίστηκαν στην συνέχεια με την μέθοδο του MLST.

## 2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Αρχικά συλλέχθηκαν κλινικά δείγματα ασθενών του ΠΓΝΛ και καλλιεργήθηκαν στα κλασσικά καλλιεργητικά υλικά, σοκολατόχρωμο άγαρ, αιματούχο άγαρ και MacConkey άγαρ. Μετά τον εμβολιασμό στα θρεπτικά υλικά ακολουθούσε επώαση για είκοσι τέσσερις ώρες σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C. Τα στελέχη που συλλέχθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως Gram αρνητικά σύμφωνα με τη χρώση Gram και ταυτοποιήθηκαν ως *Klebsiella pneumoniae* με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο ευαισθησίας.

## 3. ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM

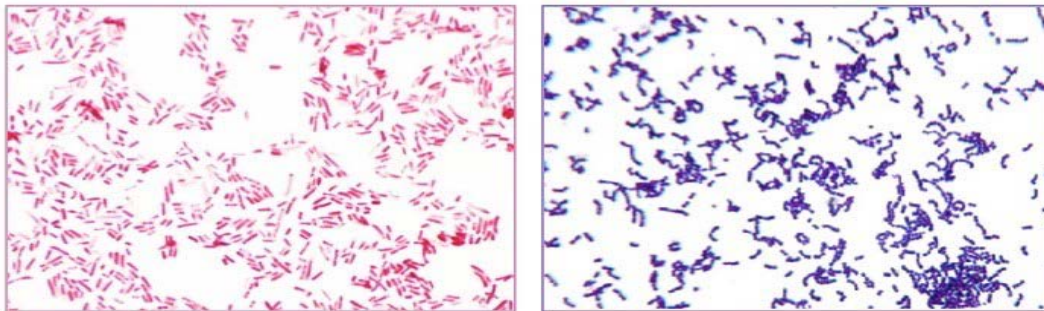
Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος. Ο μηχανισμός της χρώσης Gram συνδέεται με τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων και βασίζεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη στους δύο τύπους κυττάρων. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γετνιαής και διάλυμα Lugol (ιώδιο), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους – ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται, γεγονός που αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, όπως είναι η *Klebsiella pneumoniae*, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωμο από τη σαφρανίνη. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με τη μεθοδολογία που ακολουθεί:

## ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα crystal violet
- Διάλυμα Lugol
- Διάλυμα αποχρωματισμού (μεθανόλη και ακετόνη)
- Διάλυμα safranin
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Οπτικό μικροσκόπιο

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα crystal violet για 15-20 δευτερόλεπτα και έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, κάθε παρασκεύασμα καλύφθηκε με διάλυμα Lugol για 15 δευτερόλεπτα κι έπειτα ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Κάθε παρασκεύασμα αποχρωματίστηκε ξεπλένοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα που αποτελείται από μεθανόλη και ακετόνη και ακολούθως μεταχρωματίστηκε καλύπτοντάς το με διάλυμα σαφρανίνης για 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, ξεπλύθηκε με νερό βρύσης και μικροσκοπήθηκε. Με τη διαδικασία που περιγράφηκε, τα Gram θετικά βακτήρια χρωματίζονται σκούρα ιώδη, ενώ τα Gram αρνητικά, όπως η *Klebsiella pneumoniae*, χρωματίζονται αχνά κόκκινα (εικόνα 8).



**Εικόνα 8** Ενδεικτική εικόνα: Μέθοδος χρώσης κατά Gram ενός Gram αρνητικού βακτηρίου (αριστερά) και ενός Gram θετικού βακτηρίου (δεξιά).

## 4. ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ Vitek-2

Στην παρούσα μελέτη ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *K. pneumoniae* με χρήση του αυτόματου συστήματος Vitek-2 της Biomerieux. Πρόκειται για ένα καινοτόμο σύστημα, το οποίο χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στα νοσοκομεία τόσο για τη γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, όσο και για τον έλεγχο της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Το σύστημα περιλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, με διαθέσιμη την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα αποτελέσματα, καθώς και βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Ο ταχύς χρόνος απόκρισης συνεπάγεται την πιο γρήγορη και άμεση διεξαγωγή των αποτελεσμάτων σε σχέση

με οποιαδήποτε χειροκίνητη τεχνική ταυτοποίησης και ελέγχου της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηρίων.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, κατά τον έλεγχο αντοχής ή ευαισθησίας των υπό μελέτη στελεχών *K. pneumoniae* στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις καρβαπενέμες.

## **5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA EXTRACTION)**

Μετά την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των υπό μελέτη στελεχών της παρούσας εργασίας ακολούθησε η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA τους. Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής ιατρικής και κατ' επέκταση της μοριακής μικροβιολογίας και η απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή, μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων, όπως είναι οι πυρήνες, αποτελεί την προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης με αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης DNA.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η τεχνολογία των μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων που είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Το σύστημα εκτελεί αυτόματα όλα τα απαραίτητα βήματα, από την προετοιμασία του δείγματος μέχρι την έκλυση του καθαρού γενετικού υλικού. Τα πλεονεκτήματα είναι η ελαχιστοποίηση του κινδύνου επιμόλυνσης, ο σύντομος χρόνος απομόνωσης (45 λεπτά) και η ελάχιστη τεχνογνωσία του χειριστή. Ενώ το αρκετά υψηλό κόστος αντιδραστηρίων και μηχανήματος αποτελούν μειονέκτημα.

Υπάρχουν διάφορων ειδών μαγνητικά σφαιρίδια, που έχουν πυρήνα σιδήρου και φέρουν στη επιφάνεια τους κατάλληλη επικάλυψη για την δέσμευση των επιθυμητών μορίων. Τα μαγνητικά σφαιρίδια για την απομόνωση DNA έχουν συνήθως επικάλυψη διοξειδίου του πυριτίου, που επιτρέπει την ισχυρή πρόσδεση μορίων DNA υπό συνθήκες χαμηλού PH και υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Τα βήματα της απομόνωσης με χρήση αυτόματου μηχανήματος διαφέρουν ανά μηχανήμα αλλά τα βασικά περιλαμβάνουν την τοποθέτηση του δείγματος σε κατάλληλο σωληνάριο στην τράπεζα εργασίας του μηχανήματος, ανάδευση της κασέτας με τα προδιανεμημένα αντιδραστήρια και τοποθέτηση του στο μηχανήμα. Επιλογή του επιθυμητού προγράμματος απομόνωσης και παραλαβή των σωληναρίων με το καθαρό γενετικό υλικό. Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε σύστημα απομόνωσης Magtration® System 12GC PLUS με τα αντιδραστήρια Magtration Reagent MagDEA DNA 200 (GC).



Ο τρόπος απομόνωσης περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

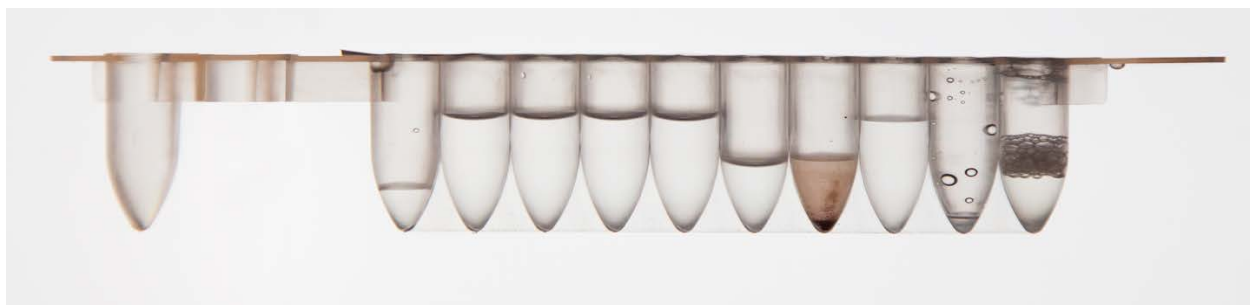
## ΥΛΙΚΑ

1. Κασέτες προγεμισμένες με αντιδραστήρια
2. Ρύγχη (tips)
3. Υποδοχείς για ρύγχη
4. Δοκιμαστικοί σωλήνες (tubes) 1,5ml με καπάκια
5. Ισοπροπυλική αλκοόλη
6. Αμπούλες στείρου φυσιολογικού ορού 3 ή 5 ml
7. Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί
8. Νεφελόμετρο για μέτρηση κλίμακας McFarland
9. Αποστειρωμένα πουάρ

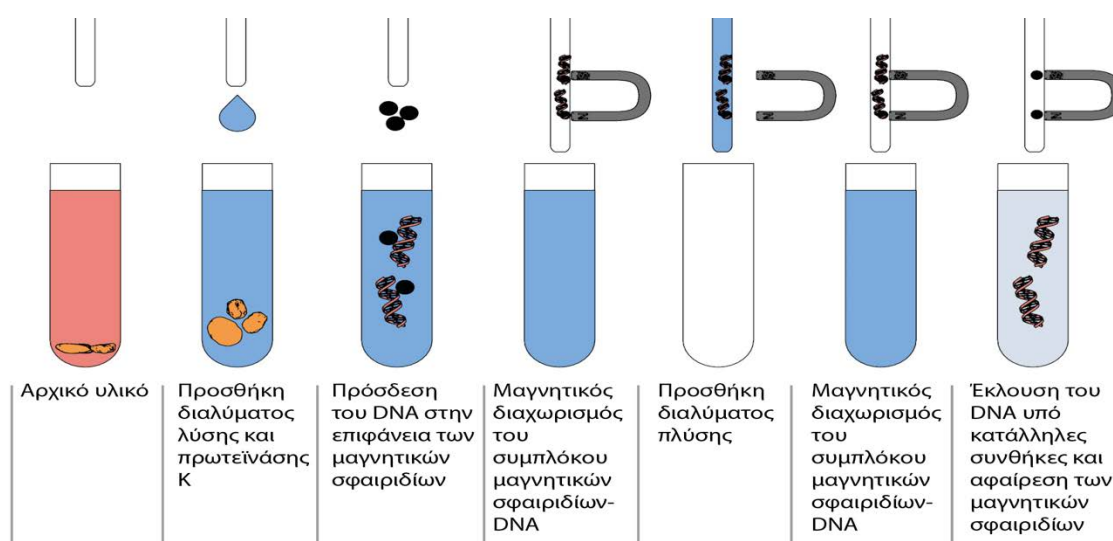
## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Από εικοσιτετράωση καλλιέργεια παρασκευάζουμε εναιώρημα θολερότητας 2-2,5 κλίμακας McFarland σε 1ml dH<sub>2</sub>O. Ακολούθως, μετά από ήπια ανακίνηση τοποθετούμε την προγεμισμένη κασέτα στο μηχάνημα (εικόνα 9) και στις υποδεικνυμένες θέσεις τοποθετούμε σωληνάκια με το δείγμα, με ισοπροπυλική αλκοόλη αλλά και άδεια καθώς και ρύγχη με τους υποδοχείς τους. Επιλέγουμε με βάση τις οδηγίες τον τελικό όγκο έκλουσης του δείγματος (50μl ή 100μl), ξεκινά η έκλουση και για 6-12 δείγματα ο απαιτούμενος χρόνος είναι περίπου 45 λεπτά.

Η διαδικασία απομόνωσης συνοψίζεται στα στάδια: λύση του δείγματος παρουσία χαοτροπικών αλάτων και απορρυπαντικού, εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και δέσμευση των μορίων DNA σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου, απομάκρυνση των μη δεσμευμένων κυτταρικών στοιχείων, διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και τέλος έκλουση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας (εικόνα 10).



**Εικόνα 9.** Κασέτα με προδιανεμημένα αντιδραστήρια. Η κασέτα περιέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αυτόματα συστήματα απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. (218)



**Εικόνα 10.** Στάδια απομόνωσης DNA με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων. Αρχικά πραγματοποιείται λύση του δείγματος παρουσία κατάλληλου διαλύματος και πρωτεΐνάσης K, προστίθενται τα μαγνητικά σφαιρίδια και εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο. Τα μόρια DNA προσροφώνται σε μαγνητικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου και τα μη δεσμευμένα κυτταρικά στοιχεία απομακρύνονται. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις για απομάκρυνση των αλάτων και άλλων αναστολέων και, τέλος, έκλυση του καθαρού DNA σε ελαφρά αλκαλικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας. (218)

## 6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία βιοχημική *in vitro* αντίδραση, η οποία επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. Αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 και είναι μία θεμελιώδης και συγχρόνως απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊκών θραυσμάτων σε ένα δείγμα.

Η PCR ως τεχνική κατέστη δυνατή με τη χρήση θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης για την ενίσχυση ειδικών τμημάτων DNA σε ένα δείγμα, εντός του οποίου βρίσκονται και διαφορετικά μόρια DNA, εκτός του DNA-στόχου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η PCR βρήκε θαυμάσια εφαρμογή στην μικροβιολογία, τόσο για την τυποποίηση και την επιδημιολογική μελέτη των μικροοργανισμών, όσο και για τη βασική έρευνα, η οποία τα τελευταία χρόνια γνωρίζει θεαματική ανάπτυξη. Η PCR, ως ειδική και ευαίσθητη μέθοδος, χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων βακτηρίων και ιών, αλλά και μυκήτων και παρασίτων, τόσο σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και σε δείγματα τροφίμων. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kits, η αύξηση της σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος, η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για ειδικές αλληλουχίες DNA, μέσω τεχνικών αλληλούχισης (sequencing), επέτρεψε την επίλυση αρχικών προβλημάτων εφαρμογής της μεθόδου στα διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια.

### **Βασικές αρχές της μεθόδου**

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA κατέχει κεντρική θέση στις μελέτες της Μοριακής Ιατρικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται στην επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Για την επίτευξη αυτού του στόχου απαιτούνται:

- i. **ένα μητρικό μόριο DNA**, το οποίο αποτελεί την αλληλουχία-στόχο που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό σημείο.
- ii. **μία DNA πολυμεράση**, δηλαδή το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα του πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) εντός της DNA αλυσίδας. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στη αντιγραφή του DNA, κατά την οποία η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για τη σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5'- 3'. Στη βιολογική δράση αρκετών πολυμερασών, αλλά όχι όλων, συμπεριλαμβάνεται και η επιδιόρθωση των λαθών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA (proofreading).
- iii. **αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινήτες (primers)**, δηλαδή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA.

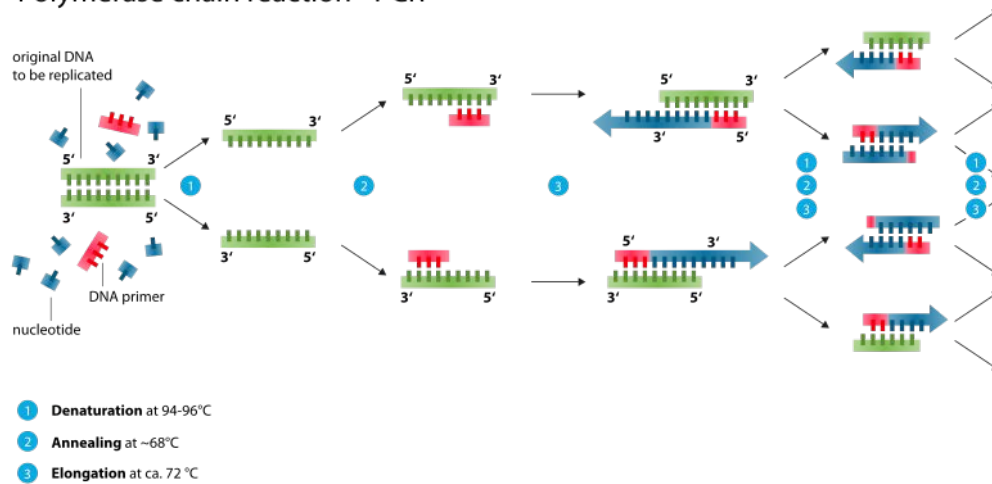
- iv. **νουκλεοτίδια (dNTPs)**, τα οποία είναι ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση.(219)

Η μέθοδος PCR εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων. Σε κάθε κύκλο αντίδρασης η ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανοποιητική ολοκλήρωση του επόμενου. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. **Στάδιο αποδιάταξης (denaturation)** του DNA, το οποίο πραγματοποιείται με θέρμανση του μείγματος μέχρι περίπου στους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου, όσο και των εκκινητών, που πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.
2. **Στάδιο αναδιάταξης ή ανασύνδεσης ή υβριδισμού (annealing)** των εκκινητών, κατά το οποίο πραγματοποιείται αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης το μείγμα της αντίδρασης κυμαίνεται σε θερμοκρασία από 40°C έως 70°C. Στο στάδιο αυτό ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'- άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.
3. **Στάδιο επιμήκυνσης (extension)**, κατά το οποίο πραγματοποιείται συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από μία DNA πολυμεράση. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι περίπου 72°C.

Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το DNA θερμαίνεται, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και σύνθεσης του DNA επαναλαμβάνεται αρκετές φορές. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA λειτουργεί ως πρότυπο για τη σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Με τη συμπλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ακολούθως ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά. Μία τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους.

## Polymerase chain reaction - PCR



**Εικόνα 11.** Σχηματικά η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η διεργασία της PCR διευκολύνθηκε πολύ με την ανακάλυψη και χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, όπως της *Taq* DNA πολυμεράσης. Το θερμοανθεκτικό αυτό ένζυμο απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*), το οποίο ζει σε θερμές πηγές με μέση θερμοκρασία 70°C έως 75°C. Το ένζυμο εμφανίζει δραστηριότητα 800 bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτών στους 95°C, με αποτέλεσμα να αντέχει σε συνεχείς αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων της PCR. Έτσι, το ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς εξυπηρετεί την παρατεταμένη επώαση στους 95°C, δεν καταστρέφεται στο στάδιο της αποδιάταξης και δε χρειάζεται να αντικαθίσταται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Επιπλέον, η εκτέλεση των αντιδράσεων ανασύνδεσης και επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνει τον πολλαπλασιασμό των μη ειδικών προϊόντων. Μειονέκτημα του ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση αποτελεί το γεγονός ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης(219).

Το γεγονός ότι η τεχνική της PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων σταδίων, οδήγησε στην αυτοματοποίηση του συνόλου της μεθόδου με τη δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών και δυνατότητα προγραμματισμού των διαφόρων αντιδράσεων, ώστε μετά από ρύθμιση των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, η διαδικασία να εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων.



**Εικόνα 12.** Μηχάνημα για PCR

### **Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου PCR**

Η τεχνική της PCR παρουσιάζει τρία κύρια πλεονεκτήματα:

**α) χρόνος:** με τη χρήση της PCR είναι δυνατό να παραχθούν περισσότερα από  $10^5$  αντίγραφα ενός τμήματος DNA, εντός λίγων ωρών. Τα στάδια της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο της ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και το στάδιο της επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Έτσι, για περίπου 30 κύκλους μίας αντίδρασης PCR απαιτούνται μόλις 3-6 ώρες.

**β) ισχύς:** η PCR έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τμήματα DNA που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση λόγω της επίδρασης του χρόνου ή άλλων αιτιών, ή βρίσκονται σε μη προσπελάσιμες θέσεις, όπως σε μονιμοποιημένους ιστούς.

**γ) ευαισθησία:** η PCR παράγει αντίγραφα του DNA-στόχου σε ποσότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν υπάρχει έστω και ένα αντίγραφο αυτού. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι που κατέστησε την PCR τόσο διαδεδομένη σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών εφαρμογών.

Εντούτοις, παρά τα ελκυστικά χαρακτηριστικά της PCR, η απόδοση της μεθόδου κρίνεται πολλές φορές, ανάλογα με τον τρόπο εφαρμογής της, μη αποδεκτή για τον πολλαπλασιασμό του DNA. Οι περιορισμοί της PCR εντοπίζονται στα εξής σημεία:

**α) αλληλουχία-στόχος:** είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της αλληλουχίας-στόχου, ώστε να συντεθούν οι εκκινητές. Επιπρόσθετα, σημαντικός περιορισμός της μεθόδου αποτελεί και το μέγεθος των DNA-στόχων, οι οποίοι μπορούν να ενισχυθούν με αξιοπιστία. Στις αλληλουχίες με μέγεθος έως 5kb η ενίσχυση θεωρείται γενικά αξιόπιστη, αλλά η ενίσχυση είναι πιο αξιόπιστη σε αλληλουχίες με μήκος 200-1000 βάσεων.

**β) δράση της Taq πολυμεράσης:** η Taq πολυμεράση δεν ασκεί πάντα τη δράση της με απόλυτη ακρίβεια, αφού σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντιθέντων κλώνων μπορεί να

περιλαμβάνεται κάποιο σφάλμα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που εισάγονται με τη βοήθεια του ενζύμου. Αυτό οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στην έλλειψη μηχανισμού διόρθωσης (*proofreading*). Συνήθως το σφάλμα αφορά στην αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Επομένως, το τελικό μείγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν όμοια, αλλά όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Με τρόπο ανάλογο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

**γ) εκκινητές:** οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η αλληλουχία των εκκινητών δεν πρέπει να περιλαμβάνει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε σειρά, κυρίως λόγω της συχνής παρουσίας τους στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ειδικότητα της πολλαπλής αντιγραφής. Παράλληλα, θα πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, καθώς το αντίθετο μειώνει την αποδοτικότητα της πολλαπλής αντιγραφής, ενώ τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR εξαρτώνται άμεσα από την ποιότητα και την καθαρότητα των εκκινητών (219).

#### ΥΛΙΚΑ

- 1) DNA βακτηρίου
- 2) WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H<sub>2</sub>O)
- 3) Taq DNA πολυμεράση 5u/μL
- 4) 10x DreamTaq Green Buffer με MgCl<sub>2</sub> (20mM)
- 5) Primer 1: 100 pmol/μL
- 6) Primer 2: 100 pmol/μL
- 7) Μείγμα dNTPs: 100mM
- 8) DNA Engine Peltier Thermal Cyclor
- 9) Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- 10) Αυτόματος αναδευτήρας Vortex
- 11) Σωληνάρια erpendorf για PCR
- 12) Αυτόματα σιφόνια (πιπέτες) 1000μL, 200μL, 20μL
- 13) Αποστειρωμένα ρύγχη

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

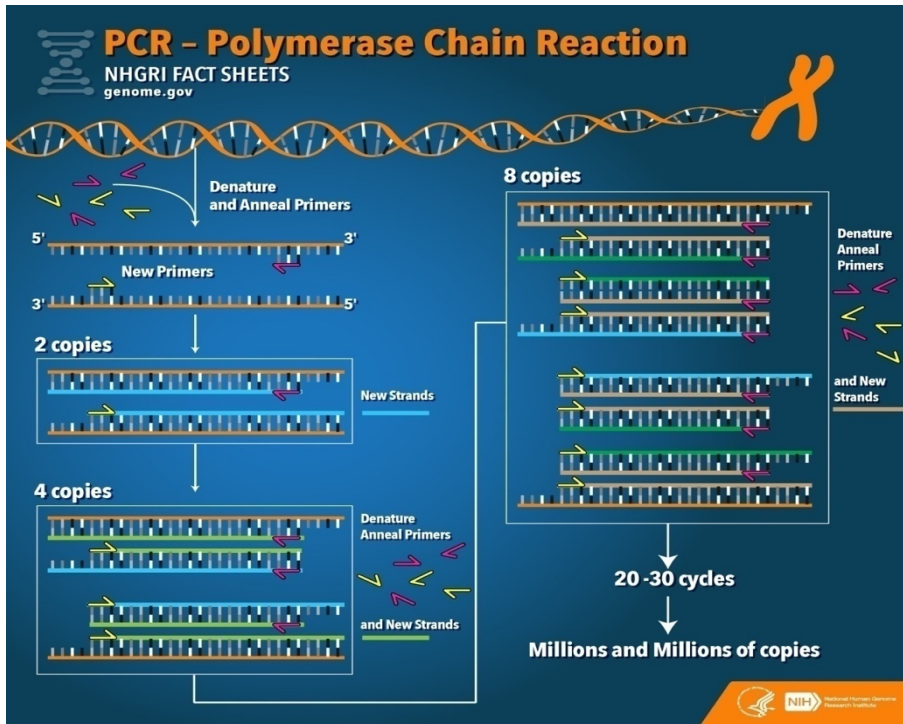
Για την εκτέλεση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης παρασκευάζεται το μείγμα έκαστης αντίδρασης αναμιγνύοντας σε erpendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες των εξής αντιδραστηρίων: DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση, 10x Taq Buffer με KCl, MgCl<sub>2</sub>, primer 1, primer 2, μείγμα dNTPs και WFI. Η

ακριβής σύνθεση του μείγματος της αντίδρασης της PCR για τελικό όγκο αντίδρασης 25μL αναφέρεται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μL)
10x Taq Buffer με MgCl <sub>2</sub>	2,5
Μείγμα dNTPs (20mM)	0,5
Primer 1 (25 pmol/μL)	0,25
Primer 2 (25 pmol/μL)	0,25
Taq DNA πολυμεράση (5u/μL)	0,2
dH <sub>2</sub> O	19,8
DNA βακτηρίου	1,5
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>25</b>

Τα 1,5 μL από κάθε δείγμα βακτηριακού DNA προστίθενται στο τέλος σε κάθε eppendorf και όλα τα eppendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής του χειριστή, αναλόγως της αντίδρασης.





**Εικόνα 13.** Συνοπτική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Τα υπό μελέτη γονίδια που ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR ήταν τα *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*. Οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Προϊόν	Συνθήκες PCR
<b>OXA-48</b>	OXA-48 F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743bp	1. 95 oC: 5min 2. 94 oC: 30sec 3. 54 oC: 1min 4. 72 oC: 2min 5. 72 oC: 10min 35 cycles
	OXA-48 R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		
<b>KPC</b>	KPC1	TCGCTAAACTCGAACAGG	800bp	1. 95oC:5min 2. 94oC:30sec 3. 55oC:30sec 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min 30 cycles
	KPC2	TTAGTGCCCGTTGACGCCCAATCC		
<b>NDM</b>	NDMF	TGGCAGGACACTTCCTATC	500bp	1. 95oC:5mim 2. 95oC:30sec 3. 50oC:30sec 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min 30cycles
	NDMR	AGATTGCCGAGCGAGCGACTTG		
<b>VIM</b>	VIMF	AGTGGTGAGTATCCGACA	261bp	1. 95oC:5mim 2. 94oC:1min 3. 56oC:1min 4. 72oC:1min 5. 72oC:10min 35 cycles
	VIMR	ATGAAAGTGCGTGGAGAC		

**Πίνακας 3.** Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*

Κατά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν, ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχής ενίσχυση των γονιδίων.

## **7. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)**

Κεντρικό σημείο στην εφαρμογή της μοριακής μεθόδου MLST αποτελεί η παροχή ενημερωμένων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, στις οποίες η πρόσβαση είναι ελεύθερη. Αυτές οι βάσεις δεδομένων αποτελούν τη βάση μίας κοινής γλώσσας για τη μοριακή τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών σε διεθνές επίπεδο.

Η μέθοδος MLST χρησιμοποιεί ως μέσο για την ανάλυση της αλληλουχίας DNA επτά γονίδια βασικού μεταβολισμού, τα οποία εδράζονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις. Τα γονίδια αυτά, τα οποία αποκαλούνται και γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή διατηρημένα γονίδια (*housekeeping genes*), βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα, δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες τυποποίησης, καθώς και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών ενός είδους βακτηρίου.

Για κάθε είδος βακτηρίου έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα γονίδια και η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος (*internal fragment*) του επιλεγέντος γονιδίου μήκους περίπου 450 bp, διαδικασία που ακολουθήθηκε και κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για κάθε είδος γονιδίου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η αλληλούχισή τους (*sequencing*). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και παρατίθενται στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές διεθνώς να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλλήλια (*alleles*) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα αλλήλια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό των αλληλίων (*allelic profile*) των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων μεταβολισμού και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο, μοναδικό τύπο αλληλουχιών (*Sequence Type, ST*). Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο, αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

Όλες οι σχετικές με τη μοριακή μέθοδο MLST πληροφορίες, όπως οι αλληλουχίες αναφοράς των αλληλίων, οι ST τύποι, καθώς και επιδημιολογικά δεδομένα είναι καταχωρημένα στην επίσημη διαδικτυακή βάση δεδομένων της τεχνικής MLST [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org).

Στην παρούσα μελέτη τα KPC, VIM, NDM και OXA-48 θετικά στελέχη *K. pneumoniae* που επιλέχθηκαν τυποποιήθηκαν μοριακά με τη μέθοδο MLST. Για το σκοπό αυτό σε κάθε στέλεχος τα επτά γονίδια μεταβολισμού της *K. pneumoniae* που ανιχνεύονται στη μέθοδο MLST (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) ενισχύθηκαν με την τεχνική της PCR. Για κάθε γονίδιο της MLST που διερευνήθηκε παρασκευάστηκαν ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε γονίδιο. Όλες οι αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, ενώ η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Taq* DNA πολυμεράση.

Το προϊόν του κάθε γονιδίου, οι αλληλουχίες των εκκινητών, καθώς και οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *K. pneumoniae* με την μέθοδο MLST αναφέρονται παρακάτω:

Γονίδιο	Προϊόν	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'	Συνθήκες PCR*	Προϊόν
<i>gapA</i>	3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεριναλδεϋδης	<b>gapA : F : 173</b>	TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	450bp
		<b>gapA : R : 181</b>	CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT		
<i>infB</i>	Παράγοντας 2 (IF-2) της έναρξης της μετάφρασης	<b>infB : 1F</b>	CTC GCT GCT GGA CTA TAT TCG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)50°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	317bp
		<b>infB : 1R</b>	CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC		
<i>mdh</i>	αφυδρογονάση του μηλικού	<b>mdh : F : 130</b>	CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	477bp
		<b>mdh : R : 867</b>	CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG		
<i>pgi</i>	φωσφογλυκοζοϊσομεράση	<b>pgi : F : 1R</b>	GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	432bp
		<b>pgi : R : 1F</b>	CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T		
<i>phoE</i>	φωσφορίνη	<b>phoE : F : 604.1</b>	ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	420bp
		<b>phoE : R : 604.2</b>	TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT		
<i>rpoB</i>	β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης	<b>rpoB : F : Vic3</b>	GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	501bp
		<b>rpoB : R : Vic2</b>	GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC		
<i>tonB</i>	Περπλασματικός μετατροπέας ενέργειας	<b>tonB : 1F</b>	CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT	1) 95°C:4min 2)94°C:30sec 3)60°C:30sec 4)72°C:1min 5)72°C:5min	414bp
		<b>tonB : 2R</b>	ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG		

\* Σε όλα τα γονίδια τα βήματα 2,3 και 4 της PCR επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

**Πίνακας 4.** Τα γονίδια, οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των στελεχών *K. pneumoniae* με την μέθοδο MLST

## 8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η μέθοδος που εφαρμόζεται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση θραυσμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη τεχνική, ικανή να διαχωρίζει μείγματα θραυσμάτων DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους.

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αгарόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αгарόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: 1) το μέγεθος του DNA, 2) τη συγκέντρωση της αгарόζης, 3) τη

στερεοδιάταξη του DNA και 4) την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μίας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% για την ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων PCR. Για κάθε προϊόν PCR πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μετά από κάθε αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε και μία μετά τον καθαρισμό του DNA (περιγράφεται παρακάτω). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

## ΥΛΙΚΑ

- WFI (Water For Injection – στείρο, απυρετογόνο H<sub>2</sub>O για τις αραιώσεις)
- 10x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA)
- Agarose SeaKem LE
- Ethidium bromide (EtBr) solution 10 mg/ml
- 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder
- Λάμπα UV
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάσης
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Αυτόματα σιφόνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά πραγματοποιείται αραιώση του 10x TBE Buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 100 ml 10x TBE και 900 ml H<sub>2</sub>O (WFI). Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμειγνύονται 100 ml 1x TBE Buffer και 2 g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμειγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης και στη συνέχεια θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει το διάλυμα διαυγές. Στη συνέχεια, αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο. Έπειτα, προστίθενται 2ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml στο διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται στο εκμαγείο και αφού σταθεροποιηθεί είναι πλέον έτοιμο για

την ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμφάνισή του σε διάλυμα 1x TBE Buffer της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αναμειγνύονται 5μl από ένα δείγμα DNA με 2μl χρωστικής Loading Dye Solution (κυανό της βρωμοφαινόλης) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πήκτωματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120 Volts και ένταση 400 mA για 30 με 40 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

## 9. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για τα γονίδια του MLST, για την απομάκρυνση των προσμείξεων της αντίδρασης είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

### ΥΛΙΚΑ

- Binding Buffer NTI
- Wash Buffer NT3
- Elution Buffer NE: 5 mM Tris/HCl, pH 8.5
- Στήλες φυγοκέντρησης με σωληνάρια συλλογής
- Σωλήνες έκλουσης (2 ml)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Αιθανόλη 96% - 100%
- Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)
- Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

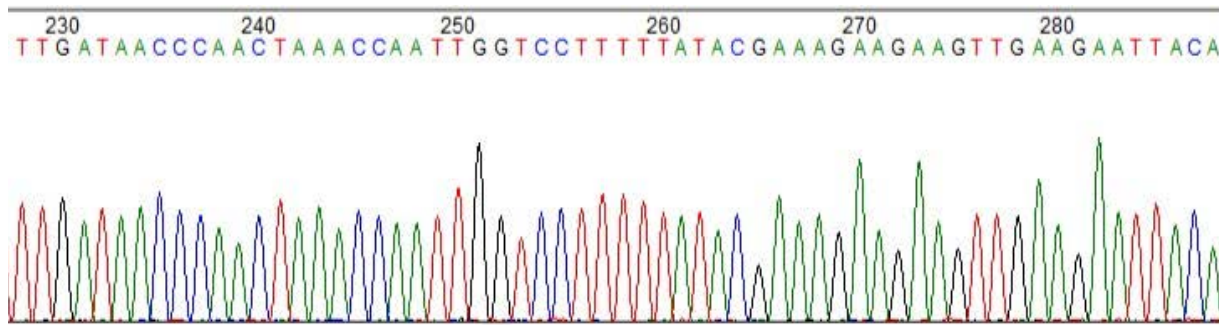
- 1) **Δέσμευση του DNA:** Σε ένα δείγμα PCR προστίθεται διπλάσιος όγκος αραιωμένου Binding Buffer NTI σε σχέση με τον όγκο του προϊόντος της PCR. Το μείγμα αναδεύεται καλά με αναρρόφηση. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PCR Clean-up Column, όπου και δεσμεύεται το DNA στη στήλη, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα στις 12.800 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

- 2) **Καθαρισμός του DNA:** Σε κάθε στήλη προστίθενται 700 μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash Buffer NT3, το μείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα στις 12.800 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Η διαδικασία αυτή γίνεται δύο φορές. Στη συνέχεια ακολουθεί επαναφυγοκέντρηση κάθε στήλης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 12.800 rpm, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Έκαστη στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf, ενώ οι προηγούμενοι σωλήνες συλλογής του διηθήματος απορρίπτονται.
- 3) **Έκλυση του DNA:** Προστίθενται 30 μl Elution Buffer NE στο κέντρο κάθε στήλης προσεκτικά, ώστε η στήλη να διαβραχεί και κατόπιν να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από τη στήλη. Στη συνέχεια, οι στήλες φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 12.800 rpm. Έκαστη στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που απομένει περιέχει πλέον το καθαρισμένο προϊόν της PCR, το οποίο και ηλεκτροφορείται, σύμφωνα με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης που περιγράφηκε παραπάνω, για επιβεβαίωση της ύπαρξης και της ποιότητάς του μετά τη διαδικασία του καθαρισμού. Τέλος, τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να αποσταλούν για αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

## 10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ MLST (Sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA των προϊόντων ενίσχυσης της PCR για τα γονίδια του MLST πραγματοποιήθηκε σε ειδικό εξωτερικό εργαστήριο. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης αποστέλλονταν στο Εργαστήριο 40 μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20 μl από ένα εκκινητή σε αραιώση 1:20 (συγκέντρωση 5 pmol/μl). Σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη *K. pneumoniae* της παρούσας εργασίας ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε και στις δύο έλικες των γονιδιακών θραυσμάτων, δηλαδή τόσο από την 5' κατεύθυνση του προϊόντος ενίσχυσης όσο και από την 3' κατεύθυνση, για μεγαλύτερη ακρίβεια.

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας των μελετώμενων γονιδίων παρουσιάζεται με τη μορφή ενός ηλεκτροφερογράμματος (electropherogram), το οποίο αποτελείται από μία σειρά κορυφών. Κάθε κορυφή (peak) αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA (A: Αδερίνη, T: Θυμίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη) και εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα, ανάλογα με το χρώμα φθορισμού (εικόνα 12). Πιο συγκεκριμένα, στο ηλεκτροφερόγραμμα αναπαρίσταται η ένταση των φθορίζοντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



**Εικόνα 14.** Ενδεικτικό ηλεκτροφερόγραμμα τμήματος ενός γονιδίου MLST για την *K. pneumoniae*.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονιδιακών θραυσμάτων, καθώς και η στοίχιση-ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequence alignment) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Mega 7.0. (εικόνα 15). Η επεξεργασία αυτή καθιστά τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώσιμες και συγκρίσιμες.



**Εικόνα 15.** Ενδεικτική εικόνα: στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δύο ελίκων DNA ενός γονιδίου της MLST για *K. pneumoniae*, με χρήση του προγράμματος Mega 7.0.

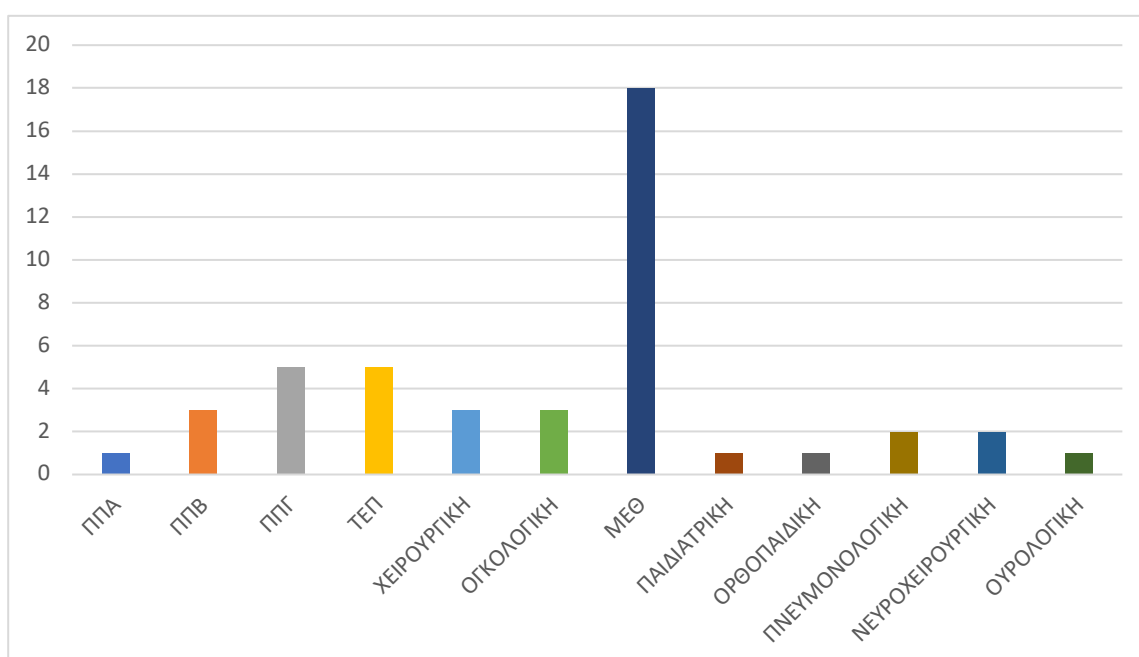
Μετά την επεξεργασία και τη μελέτη αλληλούχισης των νουκλεοτιδίων κατέστη πλέον γνωστή η ακριβής αλληλουχία καθενός από τα επτά διατηρημένα γονίδια του τυποποιημένου σχήματος της MLST, για όλα τα υπό μελέτη στελέχη *K. pneumoniae*. Στη συνέχεια, για τον καθορισμό των τύπων MLST η αλληλουχία των επτά γονιδίων συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες αλληλουχίες αναφοράς της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων της MLST και ανάλογα με τις διαφορές, τους αποδόθηκε ένας αριθμός αλληλόμορφου. Οι επτά αριθμοί που προέκυψαν από τη σύγκριση των αλληλουχιών, αντιστοιχώντας στα επτά γονίδια της MLST, αποτέλεσαν το χαρακτηριστικό αλληλόμορφο προφίλ (*allelic profile*) για κάθε στέλεχος *K. pneumoniae* το οποίο υποβλήθηκε στη βάση δεδομένων της MLST ([www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org)) και για κάθε μοναδικό συνδυασμό αποδόθηκε ένας αντίστοιχος αριθμός, ο οποίος αποτέλεσε τον τύπο αλληλουχίας (*Sequence Type, ST*) για κάθε στέλεχος. Μέσω της μεθόδου τυποποίησης MLST, η οποία κατέληξε στον καθορισμό του χαρακτηριστικού τους ST, τα υπό μελέτη στελέχη *K. pneumoniae* χαρακτηρίστηκαν με αξιοπιστία και ακρίβεια.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μελετήθηκαν συνολικά 45 καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν από 31 Μαρτίου 2021 έως 5 Μαΐου 2021.

Οι καλλιέργειες έγιναν από δείγματα αίματος, βρογχικών εκκρίσεων, ούρων, πτυέλων, καθετήρων, πύου και υγρού παροχέτευσης και προήλθαν από τις κλινικές: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), Ορθοπαιδική, Ουρολογική, Πανεπιστημιακή Παθολογική Α (ΠΠΑ), Πανεπιστημιακή Παθολογική Β (ΠΠΒ), Πανεπιστημιακή Παθολογική Γ (ΠΠΓ), Νευροχειρουργική, Χειρουργική, Πνευμονολογική, Παιδιατρική και Ογκολογική, καθώς και από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ).



**ΓΡΑΦΗΜΑ 1.** Κατανομή ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *K. pneumoniae* ανά κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση του αυτοματοποιημένου μηχανήματος Vitek-2 (BioMérieux) ως *Klebsiella pneumoniae*, ανθεκτικά σε meropenem (MIC>8mg/L) και imipenem (MIC>4mg/L), όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Χρησιμοποιώντας εναιωρήματα αποικιών *K. pneumoniae*, που είχαν εξαχθεί από τα παραπάνω δείγματα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση βακτηριακού DNA, με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί αναλυτικά προηγουμένως. Στη συνέχεια ακολούθησε διερεύνηση για την ύπαρξη των γονιδίων *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*, με ενίσχυση με PCR.

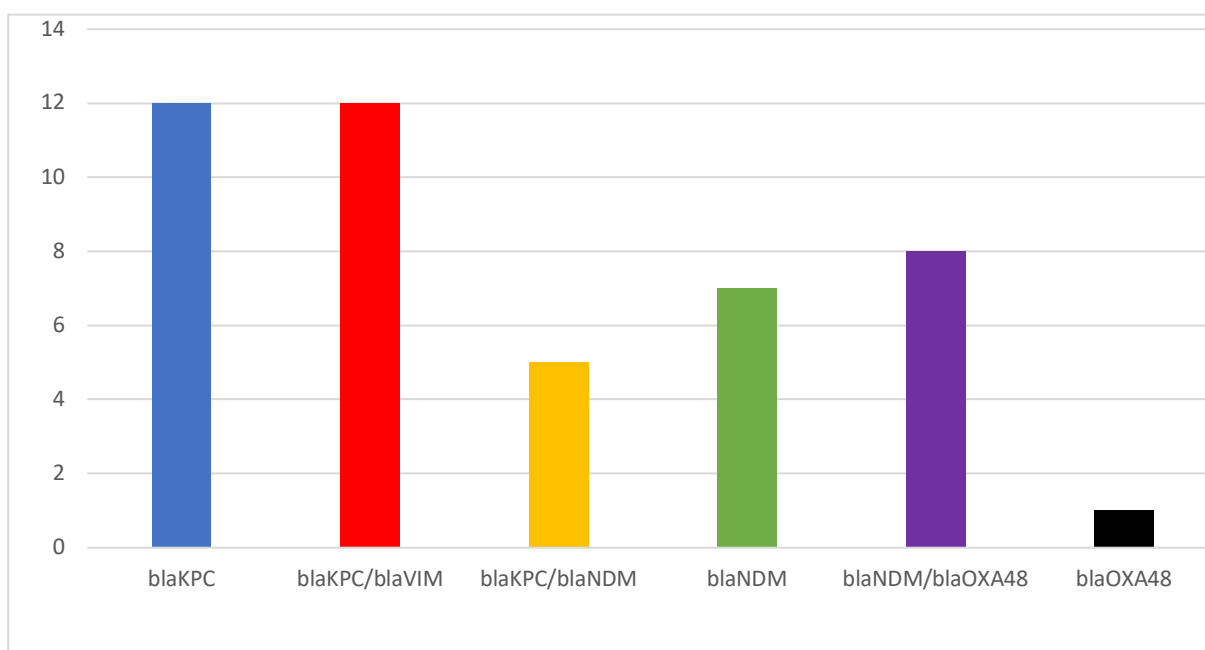
Βρέθηκε ότι τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκουν σε έξι διαφορετικές κατηγορίες ως προς την αντοχή στις καρβαπενέμες, δηλαδή είναι KPC θετικά ή KPC και VIM ή KPC και NDM ή NDM ή NDM και OXA-48 ή OXA-48.

Από τα 45 στελέχη 12 ήταν θετικά για το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>*, 12 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>*, 5 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>NDM</sub>*, 7 για το γονίδιο *bla<sub>NDM</sub>*, 8 για τα γονίδια *bla<sub>NDM</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* και 1 για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΑΞΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΔΕΙΓΜΑ	ΚΛΙΝΙΚΗ	KPC	VIM	NDM	OXA-48
1	4340	04/04/2021	ΑΙΜΑ	ΠΠΓ	+	-	-	-
2	4325	04/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
3	3904	01/04/2021	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΜΕΘ	+	-	+	-
4	3847	01/04/2021	ΥΓΡΟ ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΣΗΣ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	+	-
5	3785	31/03/2021	ΑΙΜΑ	ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	+	-	-	-
6	4118	03/04/2021	ΟΥΡΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
7	4217	03/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	-	-	-
8	4653	07/04/2021	ΑΙΜΑ	ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	-	-	+	+
9	4457	05/04/2021	ΑΙΜΑ	ΠΠΒ	-	-	+	-
10	4419	05/04/2021	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	+	-	-	-
11	3983	01/04/2021	ΑΙΜΑ	ΤΕΠ	+	-	-	-
12	4432	05/04/2021	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΠΠΓ	+	-	-	-
13	3936	01/04/2021	ΑΙΜΑ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	+	-
14	4017	02/04/2021	ΟΥΡΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
15	4882	08/04/2021	ΠΥΟ	ΜΕΘ	+	+	-	-
16	5046	11/04/2021	ΟΥΡΑ	ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ	+	-	-	-
17	4816	09/04/2021	ΟΥΡΑ	ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ	+	-	-	-
18	4848	09/04/2021	ΟΥΡΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	+	-	+	-
19	5741	16/04/2021	ΟΥΡΑ	ΤΕΠ	+	-	-	-
20	5661	16/04/2021	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	+	+
21	5802	16/04/2021	ΑΙΜΑ	ΤΕΠ	-	-	+	+
22	5870	16/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
23	5860	16/04/2021	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	+	+	-	-
24	5900	16/04/2021	ΠΥΟ	ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	+	-	-	-
25	5989	18/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	-	+	-
26	6022	18/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
27	6062	19/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
28	6153	19/04/2021	ΑΙΜΑ	ΤΕΠ	-	-	+	+
29	6225	20/04/2021	ΟΥΡΑ	ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	-	-	+	-
30	6074	19/04/2021	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	+	-	+	-
31	6301	21/04/2021	ΟΥΡΑ	ΠΠΓ	-	-	+	-
32	6331	20/04/2021	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΠΠΑ	+	-	-	-
33	6191	19/04/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
34	6350	20/04/2021	ΥΓΡΟ ΠΑΡΟΧΕΤΕΥΣΗΣ	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	+	+
35	6300	20/04/2021	ΑΙΜΑ	ΠΠΓ	-	-	+	-
36	6809	25/04/2021	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	-	-	-	+
37	6908	26/04/2021	ΟΥΡΑ	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ	-	-	+	+
38	6669	23/04/2021	ΠΤΥΕΛΑ	ΟΥΡΟΛΟΓΙΚΗ	+	-	-	-

39	7904	03/05/2021	ΑΙΜΑ	ΜΕΘ	+	+	-	-
40	8088	05/05/2021	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	+	+	-	-
41	7421	29/04/2021	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	ΜΕΘ	-	-	+	+
42	7902	03/05/2021	ΑΙΜΑ	ΤΕΠ	+	-	-	-
43	7625	03/05/2021	ΟΥΡΑ	ΠΠΓ	+	-	+	-
44	7498	01/05/2021	ΟΥΡΑ	ΠΠΒ	-	-	+	+
45	8004	05/05/2021	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	ΜΕΘ	+	+	-	-

**Πίνακας 5.** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων.



**ΓΡΑΦΗΜΑ 2.** Κατανομή των στελεχών σύμφωνα με τα γονίδια αντοχής.

Κατόπιν των μοριακών μεθόδων ανίχνευσης αντοχής σε 6 στελέχη, ένα από κάθε συνδυασμό γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες από αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, έγινε στην συνέχεια ενίσχυση με PCR των επτά housekeeping γονιδίων (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *rhoE*, *infB* και *tonB*), ακολουθούμενη από sequencing και με τη βοήθεια της διαθέσιμης βάσης δεδομένων του Ινστιτούτου Παστέρ καθορίστηκε ο τύπος αλληλουχίας τους. Συνεπώς, σύμφωνα με την βάση δεδομένων, τα KPC θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST219, τα KPC και VIM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST323, τα KPC και NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST512, τα NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST231, τα NDM και OXA-48 θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST11 και τα OXA-48 θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST39 (Πίνακας 6).

<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΑΞΗΣ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ</b>	<b>ΓΟΝΙΔΙΟ</b>	<b>ST</b>
1	4340	KPC	219
14	4017	KPC+VIM	323
30	6074	KPC+NDM	512
31	6301	NDM	231
20	5661	NDM+OXA-48	11
36	6809	OXA-48	39

**Πίνακας 6.** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανθεκτικότητα στελεχών *Klebsiella pneumoniae* στις καρβαπενέμες στην Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Το γένος *Klebsiella spp.* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* που περιλαμβάνει σαπρόφυτα συχνά απομονωμένα από το περιβάλλον. Η *Klebsiella pneumoniae* είναι το πιο συχνό είδος *Klebsiella* που απομονώνεται κλινικά και ευθύνεται για πάνω από το 70% των ανθρώπινων λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτό το γένος.(220) Στους ανθρώπους, η *K. pneumoniae* αποικίζει συχνότερα τη γαστρεντερική οδό, το δέρμα και το ρινοφάρυγγα και αποτελεί σημαντική αιτία σοβαρών λοιμώξεων στην κοινότητα, όπως νεκρωτική πνευμονία, πυογόνα αποστήματα ήπατος, ενδογενή ενδοφθαλμίτιδα.(221,222) Τα τελευταία χρόνια η *K. pneumoniae* έχει γίνει σημαντική αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (UTIs-urinary tract infections), λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού και λοιμώξεων του αίματος (BSIs-bloodstream-associated infections).(220,221,223)

Η διαχείριση των λοιμώξεων που οφείλονται στην *K. pneumoniae* περιπλέκεται από την εμφάνιση της μικροβιακής αντοχής. Οι κεφαλοσπορίνες, οι φθοροκινολόνες και η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία λοιμώξεων που οφείλονται στην *K. pneumoniae* και η αντίσταση σε αυτούς τους παράγοντες προκαλεί καθυστερήσεις στην κατάλληλη εμπειρική θεραπεία με επακόλουθη αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ασθενείς.(224) Ως εκ τούτου, οι κλινικές θεραπευτικές επιλογές για τη θεραπεία νοσοκομειακών λοιμώξεων που οφείλονται στην *K. pneumoniae* είναι περιορισμένες.(224–226) Αρκετές παγκόσμιες μελέτες επιτήρησης έχουν δείξει ότι 20-80% των στελεχών *K. pneumoniae* ήταν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής συμπεριλαμβανομένων των κεφαλοσπορινών, φθοριοκινολονών και αμινογλυκοσίδων.(227–229) Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η αναδύομενη αντοχή στις καρβαπενέμες, καθώς αυτοί οι παράγοντες είναι συχνά η τελευταία γραμμή αποτελεσματικής θεραπείας που διατίθεται για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτική (MDR-multidrug-resistant) *K. pneumoniae*.(230)

Ο πραγματικός επιπολασμός των βακτηριακών στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση παραμένει άγνωστος επειδή πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο δεν αναφέρουν ποσοστά ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου, η παγκόσμια εξάπλωση των καρβαπενεμάσεων που εκφράζουν τα Εντεροβακτηριακά αποτελεί πλέον σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία και απαιτεί προσπάθειες για στρατηγικές ανίχνευσης και ελέγχου λοιμώξεων. Η έγκαιρη αναγνώριση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση είναι υποχρεωτική για την πρόληψη της ανάπτυξης δύσκολων ή αδύνατων στη θεραπεία λοιμώξεων. Ενώ πολλές αναφορές για στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση εξακολουθούν να σχετίζονται με νοσοκομειακά απομονωμένα στελέχη, μία από τις πιο σημαντικές ανησυχίες είναι η εξάπλωση των γονιδίων

που κωδικοποιούν την καρβαπενεμάση στην κοινότητα. Αυτή η εξάπλωση θα είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί. Σε νοσοκομειακό επίπεδο, η ανίχνευση μολυσμένων ή και αποικισμένων ασθενών θα πρέπει να εφαρμόζεται για την πρόληψη εστιών που περιλαμβάνουν στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάση, μια διαδικασία που μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα λαμβάνοντας υπόψη τη διαθεσιμότητα μικροβιολογικών και μοριακών εργαλείων που έχουν αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό.

Η ανάγκη νέων φαρμάκων για τη στόχευση των πολυανθεκτικών Εντεροβακτηριακών θεωρείται επείγουσα και τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της εξάπλωσης αυτών των μικροοργανισμών έχουν αναπτυχθεί νέα αντιβιοτικά. Αυτά τα αντιβιοτικά είναι: η κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη, η μεροπενέμη-ναβορμπακτάμη, η ιμιπενέμη-ρελεμπακτάμη, η πλαζομυκίνη, η κεφιντεροκόλη, η αζτρεονάμη-αβιμπακτάμη, η εραβακυκλίνη, η κεφταρολίνη-αβιμπακτάμη, η κεφεπίμη-ζιντεμπακτάμη, η νακουμπακτάμη και το ETX2514.(231)

Ο γονότυπος και η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος των εξαιρετικά ανθεκτικών gram αρνητικών βακτηρίων έχει αποκαλύψει πολλούς από τους διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους αυτά τα βακτήρια αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Αυτή η θεμελιώδης γνώση έχει επηρεάσει την κατανόησή μας για το πώς εμφανίζεται η ανθεκτικότητα και πώς αυτή μεταφέρεται σε άλλα βακτήρια και σε ασθενείς, καθώς και την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και τις αποφάσεις θεραπείας σε ασθενείς.

Από τα 45 καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που μελετήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, 12 ήταν θετικά για το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>*, 12 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>*, 5 για τα γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>NDM</sub>*, 7 για το γονίδιο *bla<sub>NDM</sub>*, 8 για τα γονίδια *bla<sub>NDM</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* και 1 για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*. Σε 6 στελέχη, ένα από κάθε συνδυασμό γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες από αυτούς που αναφέρθηκαν παραπάνω έγινε ενίσχυση με PCR και sequencing. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Παστέρ καθορίστηκαν οι κλώνοι στους οποίους ανήκουν. Τα KPC θετικά στελέχη βρέθηκε ότι ανήκουν στον κλώνο ST219, τα KPC και VIM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST323, τα KPC και NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST512, τα NDM θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST231, τα NDM και OXA-48 θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST11 και τα OXA-48 θετικά στελέχη ανήκουν στον κλώνο ST39.

Στην Ευρώπη, η ανθεκτική στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* είναι πιο διαδεδομένη στις χώρες της Μεσογείου και των Βαλκανίων με επιπολασμό 60% στην Ελλάδα και 40% στην Ιταλία, αντίστοιχα.(232,233) Η παραγωγή καρβαπενεμασών συμπεριλαμβανομένων των KPC, NDM, VIM και OXA-48 είναι ο πιο κοινός μηχανισμός αντοχής μεταξύ των κλινικών απομονώσεων εντεροβακτηριακών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες.(122,234)

Οι KPC ήταν οι πιο συχνά παρατηρούμενες καρβαπενεμάσες τάξης A από την πρώτη τους περιγραφή στις ανατολικές ΗΠΑ το 1996.(121) Η επιδημιολογία της *K. pneumoniae* που

παράγει KPC καρβαπενεμάση ποικίλλει γεωγραφικά. Η ενδημική εξάπλωση αυτών των βακτηρίων έχει αναφερθεί στις ΗΠΑ, την Κίνα, την Ιταλία, την Πολωνία, την Ελλάδα, το Ισραήλ, τη Βραζιλία, την Αργεντινή, την Κολομβία και την Ταϊβάν.(235) Σποραδική εξάπλωση της *K. pneumoniae* που παράγει KPC έχει επίσης παρατηρηθεί σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ισπανία, η Γαλλία, η Γερμανία, η Ολλανδία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ιρλανδία, το Βέλγιο, η Σουηδία και η Φινλανδία, και σε αρκετές χώρες της περιοχής Ασίας-Ειρηνικού, συμπεριλαμβανομένης της Ινδίας, της Νότιας Κορέας και της Αυστραλίας.(235,236) Στις ΗΠΑ η μετάδοση της ανθεκτικής στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* καθοδηγείται κυρίως από την εξάπλωση οργανισμών που φέρουν ένζυμα KPC,(237) αλλά και άλλα ένζυμα καρβαπενεμάσης, όπως η μεταλλο-β-λακταμάση του Νέου Δελχί (NDM), έχουν επίσης προκύψει.(208)

Στην Ελλάδα, η *K. pneumoniae* που παράγει KPC απομονώθηκε για πρώτη φορά τον Αύγουστο του 2007 (238) και ο επιπολασμός των παραγωγών KPC μεταξύ των απομονώσεων *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση που συλλέχθηκαν σε τριτοβάθμιο ελληνικό νοσοκομείο αυξήθηκε από 0% στο 2003 σε 38,3% το 2010.(239) Ενώ πολλά στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση στις ΗΠΑ και την Ελλάδα είχαν ένζυμα KPC,(239,240) αρκετές μελέτες στην Ισπανία έδειξαν ότι τα περισσότερα καρβαπενεμάση ανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* περιείχαν OXA-48 ή καρβαπενεμάσες τάξης B και το ποσοστό των *K. pneumoniae* που παράγουν KPC ήταν πολύ χαμηλό (2–3%). (241,242) Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο επικρατέστερος γονότυπος της *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση ποικίλλει γεωγραφικά. Για παράδειγμα, στην Ιταλία, η οποία είναι μια αντιπροσωπευτική χώρα της Νότιας Ευρώπης όπου η KPC γίνεται ενδημική, το 89,5% των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες έχει αναφερθεί ότι έχουν ένζυμα τύπου KPC και ακολουθούν το VIM-1 (9,2%) και το OXA-48 (1,3%).(243)

Στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού, η ενδημική διάδοση του *K. pneumoniae* που παράγει KPC έχει αναφερθεί στην Κίνα (244) και την Ταϊβάν (245) και η σποραδική εξάπλωση έχει αναφερθεί στην Ινδία (246), Νότια Κορέα (247) και Αυστραλία (248). Στην Κίνα, η συχνότητα των ενζύμων τύπου KPC μεταξύ των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση ήταν υψηλή (63%).(244) Ενώ ο ST258 είναι ο κυρίαρχος κλώνος που παρατηρείται στις ευρωπαϊκές χώρες και στις Η.Π.Α.,(243,249,250) ο ST11 που σχετίζεται με τον ST258 είναι ο πιο διαδεδομένος κλώνος που σχετίζεται με την εξάπλωση της *K. pneumoniae* που παράγει KPC στην Ασία (ιδιαίτερα στην Κίνα και στην Ταϊβάν).(245,251,252) ST11 που παράγει KPC έχει επίσης αναφερθεί στη Λατινική Αμερική.(235) *K. pneumoniae* που παράγει KPC ανιχνεύθηκε επίσης πρόσφατα στην Ιαπωνία (253), στο Πακιστάν (254), στο Ιράν (255) και στα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (256). Στην Αραβική Χερσόνησο, ο επιπολασμός της *K. pneumoniae* που παράγει KPC ήταν πολύ χαμηλός σε σύγκριση με τις καρβαπενεμάσες τύπου NDM-1 και OXA-48.(257)

Η συνύπαρξη KPC και άλλων καρβαπενεμασών στην *K. pneumoniae* έχει αναφερθεί συχνά παγκοσμίως σε αρκετές χώρες όπως Ιταλία (KPC-3/VIM-2 και KPC-2/VIM-1) (258,259), Κολομβία (KPC-2/VIM-24) (260), Βραζιλία (KPC-2/NDM-1) (261), Κίνα (KPC-2/NDM-1, KPC-2/CMY-2 και KPC-2/IMP-4) (262–264), Καναδά (KPC-3/CMY-2) (265) και Ελλάδα (KPC-2/VIM-1) (266).

Η NDM-1 καρβαπενεμάση εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 2008 σε *K. pneumoniae* και *E. coli* σε έναν ασθενή που επέστρεψε στη Σουηδία από την Ινδία και έκτοτε εξαπλώθηκε παγκοσμίως (177,267). Από το 2008 η *K. pneumoniae* που παράγει NDM εξαπλώθηκε γρήγορα σε πολλές χώρες (268) και θεωρείται ότι είναι ενδημική στην ινδική υποήπειρο, συμπεριλαμβανομένης της Ινδίας, του Πακιστάν και του Μπαγκλαντές.(236,269) Σποραδική εξάπλωση έχει αναφερθεί σε ΗΠΑ (270,271), Καναδά (272–274), Κολομβία (275,276), Ισπανία(241,277), Γαλλία (278,279), Ελβετία (280,281), Ιταλία (282), Ηνωμένο Βασίλειο (179,283), Ελλάδα (281,284), Τουρκία (285,286), Μαρόκο (287,288), Νότια Αφρική (289,290), Σιγκαπούρη (291–293), Σαουδική Αραβία (294,295), Ομάν (295,296), Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (297,298), Κουβέιτ (257,299), Κίνα (264,300,301), Ιαπωνία (302,303), Ταϊβάν (245,304), Νότια Κορέα (305,306) και Αυστραλία (307,308).

Τα Βαλκανικά κράτη (284,309), η Αραβική Χερσόνησος (236) και οι χώρες της Βόρειας Αφρικής (310), έχουν επίσης θεωρηθεί πρόσφατα ως πρόσθετη δεξαμενή παραγωγών NDM. Στην Ελλάδα μεταξύ 132 μη επαναλαμβανόμενων απομονώσεων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες εντεροβακτηριακών μεταξύ 2010 και 2013, εντοπίστηκαν 78 στελέχη *K. pneumoniae* με το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>* (284).

Η μετακίνηση ασθενών μεταξύ χωρών μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για τη διεθνή εξάπλωση της *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση (268). Gram αρνητικά βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάση, συμπεριλαμβανομένης της *K. pneumoniae*, που ελήφθησαν από ασθενείς που ταξίδεψαν πρόσφατα εκτός Καναδά μεταξύ 2010 και 2013, βρέθηκαν να είναι *K. pneumoniae* που παράγουν NDM και ανήκουν σε διάφορους κλώνους (ST15, ST16, ST147, ST28, ST340, ST512 και ST972) με διαφορετικά πλασμίδια (IncF, IncA/C και IncL/M) και εισήχθησαν από την Ινδία στον Καναδά.(311)

Όπως και με την KPC, η συνύπαρξη NDMs και άλλων καρβαπενεμασών στην *K. pneumoniae* έχει επίσης αναφερθεί παγκοσμίως, στη Βραζιλία (NDM-1/KPC-2) (261), Μαλαισία (NDM-1/OXA-232) (312), Νότια Κορέα (NDM-5/OXA-181) (306), Κίνα (NDM-1/IMP-4) (313), Ινδία (NDM-1/OXA-232) (312), Τουρκία (NDM-1/OXA-48) (286), Πακιστάν (NDM-1/KPC-2) (314), Ελβετία (NDM-1/OXA-48) (315), Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (NDM-1/OXA-48) (298), Αυστραλία (NDM-1/OXA-48) (316), Μαρόκο (NDM-1/OXA-48) (288), Σιγκαπούρη (NDM-1/OXA-181 και NDM-5/OXA-181) (292), και ΗΠΑ (NDM-1/OXA-232) (271).



Εκτός από τις καρβαπενεμάσες τύπου NDM, οι IMP και VIM έχουν επίσης ανιχνευθεί παγκοσμίως στην *K. pneumoniae*. Από τότε που ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά IMP και VIP σε *Serratia marcescens* το 1991 και σε *Pseudomonas aeruginosa* το 1996, αντίστοιχα (91,216), η *K. pneumoniae* που παράγει IMP και VIM έχει εξαπλωθεί στην Ευρώπη και στην Ασία, αλλά σπάνια έχει αναφερθεί σε άλλες περιοχές, όπως η Αμερική και η Αφρική.(317)

Από τις OXA β-λακταμάσες τάξης D μόνο κάποιες υποομάδες όπως οι OXA-23, OXA-48, OXA-51 και OXA-58 έχουν αναφερθεί στην *K. pneumoniae* (318). Η OXA-48 εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε *K. pneumoniae* στην Τουρκία το 2003 (95) και μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί 10 παραλλαγές του γονιδίου *bla<sub>OXA-48</sub>* (267). Η Τουρκία είναι μία από τις κύριες δεξαμενές *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48 (236). Από το 2003, η ενδημική εξάπλωση αυτών των βακτηρίων έχει αναφερθεί σε χώρες όπως η Τουρκία, το Μαρόκο, η Λιβύη, η Αίγυπτος, η Τυνησία και η Ινδία (236). Σποραδική εξάπλωση έχει αναφερθεί σε Γαλλία (319,320), Ισπανία (241,321), Ιταλία (243,322), Βέλγιο (323,324), Ολλανδία (193,325), Ηνωμένο Βασίλειο (326,327), Γερμανία (328,329), Ελβετία (315,330), Αργεντινή (208,331), Λίβανο (332), Ισραήλ (333,334), Κουβέιτ (295,335), Σαουδική Αραβία (264,294) και Ιαπωνία (336,337). Ο επιπολασμός των καρβαπενεμάσεων OXA-48 μεταξύ των *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση στην Ισπανία και τη Γαλλία ήταν ιδιαίτερα υψηλός (74% και 78%, αντίστοιχα) (242,279). Στην Αφρική *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48 έχει αναφερθεί κυρίως στις βόρειες χώρες όπως Μαρόκο, Λιβύη, Αίγυπτος, Τυνησία και Αλγερία. Στην Αραβική Χερσόνησο, ο επιπολασμός της OXA-48 σε *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση ήταν επίσης υψηλός (32,5%–56%).(257,295)

Η *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48 ανιχνεύθηκε επίσης πρόσφατα σε Καναδά (338), ΗΠΑ (209), Ιρλανδία (339), Πολωνία (340), Ουγγαρία (341), Ελλάδα (342), Ρουμανία (343), Βουλγαρία (344), Φινλανδία (345), Ρωσία (346), Αλγερία (347), Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (348), Ιράν (349), Νότια Αφρική (350), Σενεγάλη (189), Ταϊβάν (351), Σιγκαπούρη (352), Νότια Κορέα (267) και Αυστραλία (353). Στη Βόρεια Αμερική η συχνότητα των ενζύμων OXA-48 μεταξύ στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση ήταν πολύ χαμηλή (11%) (208). Μια πρόσφατη αναφορά στη Ρουμανία έδειξε ότι μεταξύ 65 στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση, το πιο συχνά αναγνωρισμένο γονίδιο ήταν το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* (78%), 12% ήταν θετικά για το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*, 6% είχαν το γονίδιο *bla<sub>KPC-2</sub>* (343).

Η συνύπαρξη OXA-48 και άλλων καρβαπενεμασών στην *K. pneumoniae* έχει αναφερθεί συχνά παγκοσμίως σε χώρες όπως Τουρκία (OXA-48/NDM-1) (286), Ελβετία (OXA-48/NDM-1) (315), Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα (OXA-48/NDM-1) (298), Αυστραλία (OXA-48/NDM-1) (316), Μαρόκο (OXA-48/NDM-1) (288), Ινδία (OXA-181/VIM-5) (192),

Σιγκαπούρη (ΟΧΑ-181/NDM-1 και ΟΧΑ-181/NDM-5) (292), ΗΠΑ (ΟΧΑ-232/NDM-1) (271) και Ινδία (ΟΧΑ-232/NDM-1) (312).

Ο κλώνος ST11 είναι ο κυρίαρχος κλώνος της ανθεκτικής στην καρβαπενέμη *K. pneumoniae* στην Κίνα και είναι κυρίως KPC-2 σύμφωνα με μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2011 και διεξήχθη από το 2006 μέχρι το 2009.(251) Υπάρχουν ωστόσο και άλλες μελέτες που το αποδεικνύουν όπως αυτή που δημοσιεύτηκε το 2020 και αφορούσε ασθενείς στην Κίνα από το 2008 έως το 2018. Αναλυτικά από το 2008 έως το 2013 ο κυρίαρχος κλώνος *K. pneumoniae* ανθεκτικής στις καρβαπενέμες ήταν ο ST11, ακολουθούμενος από τον ST15 και είχε καρβαπενεμάση KPC-2. Η κλωνική διάδοση *K. pneumoniae* που παράγει NDM-1 και *K. pneumoniae* που παράγει ΟΧΑ-232 ανακαλύφθηκε το 2014-2015 και το 2018, αντίστοιχα. Επιπλέον, ένα στέλεχος ST11 που ανακτήθηκε το 2018 αποδείχθηκε ότι έχει τόσο  $bla_{NDM-1}$  όσο και  $bla_{KPC-2}$ .(354)

Σε άλλη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021 βρέθηκαν 34 στελέχη *K. pneumoniae* ST11 σε τέσσερα νοσοκομεία στην Κίνα από το 2005 μέχρι το 2019. Από αυτά τα 34 στελέχη, τα 31 ήταν *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες, από τα οποία τα 30 έφεραν το γονίδιο  $bla_{KPC-2}$  με το υπόλοιπο στέλεχος να στερείται οποιουδήποτε γνωστού γονιδίου που κωδικοποιεί καρβαπενεμάση.(355)

Σε μία μελέτη του 2020 αναφέρθηκε η παραγωγή NDM-7 σε στέλεχος *K. pneumoniae* που ανήκει στον κλώνο ST11 και απομονώθηκε από αγόρι που νοσηλεύτηκε στην παιδιατρική μονάδα εντατικής θεραπείας ενός νοσοκομείου στην Κίνα το 2018. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στελέχους NDM-7 σε ST11 στην Κίνα.(356)

Συνύπαρξη γονιδίων  $bla_{KPC}$  και  $bla_{NDM}$  έχει βρεθεί σε ένα ανθεκτικό στην καρβαπενέμη στέλεχος *K. pneumoniae* που ανήκε στον κλώνο ST11 το 2020 στο Βούξι στην Κίνα σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021.(357)

Ωστόσο σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 αναφέρεται μετάδοση και εξέλιξη της *K. pneumoniae* ST11 που παράγει ΟΧΑ-48 σε ένα μόνο νοσοκομείο στην Ταϊβάν στην Κίνα μεταξύ 2013 και 2015.(358)

Στέλεχος *K. pneumoniae* που έχει καρβαπενεμάση NDM-1 και ανήκει στον κλώνο ST11 έχει βρεθεί σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021 στο Πακιστάν.(359)

Στην Ευρώπη ο ST11 αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του κλινικού πληθυσμού της *K. pneumoniae* και τα  $bla_{NDM-1}$  και  $bla_{ΟΧΑ-48}$  είναι τα κυρίαρχα γονίδια στον ST11.

Η *K. pneumoniae* που φέρει το γονίδιο  $bla_{NDM}$  ανήκει κυρίως σε κάποιον από τους κλώνους ST11, ST14, ST15 ή ST147.(360) Μέχρι το 2014 η Ελλάδα ανέφερε συνεχιζόμενα κρούσματα νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκλήθηκαν από στελέχη *K. pneumoniae* τύπου 11 (ST11) που έφεραν το γονίδιο  $bla_{NDM-1}$ , που πιστεύεται ότι εισήχθη για πρώτη φορά μέσω ταξιδιού από την περιοχή των ανατολικών Βαλκανίων.(284) Η εμφάνιση του NDM-1 σε στελέχη *K.*

*pneumoniae* στην Ελλάδα έλαβε χώρα το 2011. Συνολικά 78 στελέχη NDM-1 απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Αυτά τα στελέχη θεωρήθηκε ότι προκάλεσαν δύο διαφορετικές επιδημίες, σαφώς διαχωρισμένες μεταξύ τους, η πρώτη τον Νοέμβριο και τον Δεκέμβριο του 2011 και η δεύτερη από τον Μάιο του 2012 έως τον Ιούνιο του 2013. Βρέθηκε ότι και τα 78 στελέχη ανήκαν στον ίδιο κλώνο. Η MLST έδειξε ότι όλα τα στελέχη ανήκαν στον τύπο ST11 που θεωρείται παραλλαγή του ST258. Αυτός ο κλώνος υποτίθεται ότι έχει επιδημιολογική σχέση με την ινδική υποήπειρο, όπως έχουν οι περισσότεροι κλώνοι ST11 που είναι NDM στην Ευρώπη.(284) Έκτοτε, έχουν αναφερθεί σποραδικές περιπτώσεις στελεχών *K. pneumoniae* που μεταφέρουν το γονίδιο NDM-1 σε νοσοκομεία της Αθήνας, της Πάτρας και σε άλλες υγειονομικές εγκαταστάσεις. Αυτά τα στελέχη ταξινομήθηκαν επίσης στον τύπο ST11.(281,361)

Η εμφάνιση και η εξάπλωση της *K. pneumoniae* που κωδικοποιεί το NDM-1 προκαλεί παγκόσμια ανησυχία, ενώ ένα δεύτερο επίκεντρο διάδοσής της μετά την ινδική υποήπειρο πιστεύεται ότι βρίσκεται στα Βαλκάνια. Σε μία μελέτη του 2018 παρουσιάστηκε η πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος μιας *K. pneumoniae* που παράγει NDM-1 και ανήκει στον κλώνο ST11 που απομονώθηκε σε ιδιωτικό εργαστήριο στην Ελλάδα το 2015.(362)

Στην Ελλάδα, η πρώτη έξαρση καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48 μεταξύ των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση εντοπίστηκε το 2012. Όλα τα στελέχη της εστίας είχαν τα ίδια μοριακά χαρακτηριστικά με τα στελέχη που είχαν απομονωθεί προηγουμένως στην Τουρκία και το Βέλγιο. Τα στελέχη αυτά ανήκαν σε έναν μόνο κλώνο, τον κλώνο ST11. Ο ST11 σπάνια συνδέεται με καρβαπενεμάσες τύπου OXA.(342) Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος της καρβαπενεμάσης τύπου OXA-48 που παράγει η *K. pneumoniae* που ανήκει στον κλώνο ST11 επιτεύχθηκε στην Ισπανία το 2013.(363) Από το 2012, εκτός από μεμονωμένα κρούσματα, δεν έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα σημαντικές επιδημίες που να προκαλούνται από στελέχη *K. pneumoniae* OXA θετικά, καθώς η μολυσματικότητά τους δεν φαίνεται να είναι τόσο μεγάλη.(141,342,364)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2015 και αφορούσε 83 νοσοκομεία στην Ισπανία το 2013, με τη χρήση της MLST εντοπίστηκαν 24 διαφορετικοί τύποι αλληλουχίας (ST) μεταξύ 221 στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση. Τα πιο διαδεδομένα ST ήταν τα ST11 (29,9%), ST405 (29,4%), ST15 (12,7%) και ST326 (6,8%). Αυτά τα τέσσερα ST βρέθηκαν στο 78,8% των απομονώσεων *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση. Το ST11 έφερε τέσσερις διαφορετικούς τύπους καρβαπενεμάσης (VIM-1, OXA-48, KPC-2 και OXA-245), αλλά το ST405 έφερε μόνο OXA-48. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η *K. pneumoniae* που ανήκει στα ST11 και ST405 συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη διάδοση των *Enterobacteriaceae* που παράγουν OXA-48 στην Ισπανία. Το ST11 έχει αναγνωριστεί ως ένας διεθνής κλώνος υψηλού κινδύνου που σχετίζεται με την παραγωγή ESBL και καρβαπενεμάσης,

αλλά ο ST405 έχει πρόσφατα συσχετιστεί με την παραγωγή OXA-48 στην Ισπανία, το Βέλγιο και τη Γαλλία.(365)

Σε μία μελέτη στην Ισπανία που δημοσιεύτηκε το 2020 μελετήθηκαν από το 2012 έως το 2013 εντεροβακτηριακά που παράγουν OXA-48. Οι *K. pneumoniae* που ήταν OXA-48 ανήκαν σε 7 τύπους αλληλουχίας (ST), συγκεκριμένα στους ST11, ST15, ST307, ST405, ST487, ST712 και ST971. Οι ST11 και ST405 ήταν οι κλώνοι που βρέθηκαν πιο συχνά. Σε αυτούς τους κλώνους βρέθηκαν και στελέχη *K. pneumoniae* στα οποία συνυπήρχε CTX-M-15 ή VIM-1 και CTX-M-15.(366)

Το 2015 και το 2016 η Πολωνία κατέγραψε ταχεία εξάπλωση των *Enterobacterales* που παράγουν NDM-1 με τουλάχιστον 470 και 1780 περιπτώσεις, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ των εντεροβακτηριακών βρέθηκαν αρκετά στελέχη *K. pneumoniae* NDM-1 που ανήκαν στον κλώνο ST11.(367)

Το 2016 απομονώθηκε στέλεχος *K. pneumoniae* με συνύπαρξη γονιδίων *bla<sub>NDM-1</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* από δείγμα αίματος νοσηλευόμενου στη Θεσσαλονίκη το οποίο ανήκε στον κλώνο ST11. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται τέτοιος συνδυασμός στην Ελλάδα όπου επικρατούν οι καρβαπενεμάσες KPC και VIM και περίπου το 5% των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση και απομονώνονται στα νοσοκομεία έχουν ταυτόχρονα KPC και VIM καρβαπενεμάσες.(368)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020 βρέθηκαν στο Ιράν από το 2017 έως το 2018 στέλεχη *K. pneumoniae* που ανήκαν στον κλώνο ST11 και είχαν καρβαπενεμάσες OXA-48 ή OXA-48 και NDM-1 ή OXA-48 και NDM-7.(369) Μία μελέτη του 2019 που διεξήχθη από το 2012 έως το 2015 έδειξε την ανίχνευση ενός στελέχους *K. pneumoniae* με καρβαπενεμάση NDM-1 που ανήκε στον κλώνο ST11 στον Λίβανο (370).

Συνύπαρξη γονιδίων *bla<sub>NDM-1</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* σε στέλεχος *K. pneumoniae* που όμως ανήκε στον κλώνο ST307 βρέθηκε για πρώτη φορά στην Κίνα το 2015.(371) Η συνύπαρξη *bla<sub>NDM-1</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>* σε στέλεχος *K. pneumoniae* έχει αναφερθεί και στην Κωνσταντινούπολη, στην Τουρκία σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017 και διεξήχθη από το 2014 μέχρι το 2016.(372)

Στο Βέλγιο, μια πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη σε 24 βελγικά νοσοκομεία το 2012 έδειξε ότι μεταξύ 4564 απομονώσεων *Enterobacteriaceae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες που εξετάστηκαν η *Klebsiella pneumoniae* ήταν το πιο συχνό είδος και η OXA-48 η καρβαπενεμάση που συναντάται συχνότερα.(373) Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2016 και αφορούσε 120 νοσοκομεία του Βελγίου από το 2013 μέχρι το 2014 βρέθηκε ότι τα στελέχη *K. Pneumoniae* που παράγουν KPC ανήκουν κυρίως στους κλώνους ST512 και ST101. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαίωσαν τη σχεδόν πλήρη αντικατάσταση του ST258 από τους κλώνους ST512 και ST101 μεταξύ των στελεχών που παράγουν KPC που παρατηρήθηκαν από το 2011 στο Βέλγιο.(374) Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε μια πιο διαφοροποιημένη εικόνα για

την *K. pneumoniae* που παράγει OXA-48 καθώς βρέθηκαν τρεις κύριοι κλώνοι που σχετίζονται με την OXA-48, οι ST405, ST788 και ST11.(375)

Η πλειοψηφία των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC παγκοσμίως ανήκουν στον κλώνο ST258 και τις παραλλαγές του (π.χ. ST512).(235,250) Ένα στέλεχος που απομονώθηκε στη Γαλλία το 2014 με διαταραχή του γονιδίου *mgrB* ανήκε στον κλώνο ST512 (376). Στην Ιταλία τα απομονωμένα στελέχη τείνουν να είναι ενδημικά. Μια μελέτη που περιελάμβανε 66 στελέχη που απομονώθηκαν από νοσοκομεία της Ιταλίας και της Ελλάδας μεταξύ 2010 και 2012 αποκάλυψε ότι όλα τα ελληνικά απομονωμένα στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST258, ενώ ο κλώνος ST512 ήταν σχεδόν τόσο συχνός όσο ο ST258 σε όλη την Ιταλία.(377)

Σε μία μελέτη που έγινε στη Ρώμη (από το 2013 έως το 2016) και δημοσιεύτηκε το 2020 το γονίδιο *bla<sub>KPC</sub>* υπήρχε σε 121 από τα 147 (87%) στελέχη, κυρίως *K. Pneumoniae* (97%). Τα υπόλοιπα στελέχη έφεραν *bla<sub>VIM</sub>* ή *bla<sub>OXA-48</sub>*. Από τα 121 στελέχη *K. pneumoniae* τα 12 (10%) έφεραν γονίδια *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>VIM</sub>* και ένα *bla<sub>KPC</sub>* και *bla<sub>OXA-48</sub>*. Μεταξύ των 35 στελεχών *K. pneumoniae* που αναλύθηκαν με MLST βρέθηκε ότι ο πιο διαδεδομένος κλώνος σε αυτή τη μελέτη ήταν ο ST512 ακολουθούμενος από τους ST101, ST45 και ST307.(378)

Η πρώτη απομόνωση μιας *K. pneumoniae* που ανήκε στον κλώνο ST512 και είχε καρβαπενεμάση KPC-3 σε νοσοκομείο στη Νάπολη, στη νότια Ιταλία αναφέρεται σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2013 και διεξήχθη από το 2011 έως το 2012(379).

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 πραγματοποιήθηκε μοριακός χαρακτηρισμός ανθεκτικής στην καρβαπενέμη *K. pneumoniae* που απομονώθηκε από δείγματα αίματος νοσηλευόμενων ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Βερόνας από το 2017 μέχρι το 2018. Η συνύπαρξη SHV-1/CTX-M-15/KPC-3 και SHV-1/CTX-M-15/OXA-48 β-λακταμασών διαπιστώθηκε στο 89% και 11% των στελεχών *K. Pneumoniae* αντίστοιχα. Στον κλώνο ST512 ανήκε *K. pneumoniae* KPC-3 και στον ST14 *K. Pneumoniae* OXA-48.(380) KPC-3 *K. pneumoniae* ST512 βρέθηκε και το 2014 στο Παλέρμο της Ιταλίας. Στο στέλεχος αυτό το γονίδιο *bla<sub>KPC-3</sub>* εντοπίστηκε στο πλασμίδιο IncX3 η πλήρης αλληλουχία του οποίου προσδιορίστηκε.(381)

Τα αποτελέσματα μιας έρευνας που έγινε από το 2011 μέχρι το 2013 και δημοσιεύτηκε το 2016 επιβεβαίωσαν την εξαιρετικά ενδημική φύση της *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση σε ολόκληρη την ιταλική επικράτεια. Βρέθηκε ότι η παραγωγή KPC αντιπροσωπεύει τον πιο συχνό μηχανισμό αντίστασης στις καρβαπενέμες. Εννέα διαφορετικοί κλώνοι ανιχνεύθηκαν μεταξύ των KPC στελεχών (ST512, ST258, ST1879, ST101, ST1633, ST15, ST307, ST45 και ST2032) με την πλειοψηφία των απομονώσεων (94%) να ανήκουν στον κλώνο ST258 και τις παραλλαγές του ST512 και ST1879.(382)

Μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2014 αναφέρει μηνιγγίτιδα από *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση KPC-3 κατηγορίας A σε παιδί 6 μηνών στην Αλγερία το 2013. Η MLST έδειξε ότι αυτή ανήκε στον κλώνο ST512, μια παραλλαγή του ST258. Αυτή ήταν η πρώτη αναφορά για KPC-3 *K. pneumoniae* ST512 σε χώρα της Βόρειας Αφρικής.(383)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2018 μελετήθηκαν 15 στελέχη *K. Pneumoniae* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες σε νοσοκομείο στην Ιερουσαλήμ στο Ισραήλ από το 2008 έως το 2011. Η γονιδιωματική μελέτη αποκάλυψε ότι η αντοχή στην καρβαπενέμη οφειλόταν στην παραγωγή του ενζύμου KPC-3 σε 13 απομονώσεις και του ενζύμου NDM-1 στις υπόλοιπες 2 απομονώσεις. Τα στελέχη *K. pneumoniae* KPC-3 ανήκαν στους κλώνους ST16, ST258 και ST512 ενώ τα στελέχη *K. pneumoniae* NDM-1 στον κλώνο ST76.(384)

Μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017 αφορούσε εξακόσιες οκτώ περιπτώσεις KPC στελεχών *K. pneumoniae* που εντοπίστηκαν στην Πολωνία από το 2010 έως το 2014, σχεδόν οι μισές από τις οποίες συνέβησαν στην περιοχή της Βαρσοβίας και άλλες μισές σε τέσσερις άλλες περιοχές. Όλα τα στελέχη ανήκαν στους κλώνους ST258 ή ST512 οι οποίοι είχαν KPC-3 καρβαπενεμάση.(385)

Στην Ισπανία στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC-3 και ανήκουν στον κλώνο ST512 βρέθηκαν για πρώτη φορά το 2012. Το πρώτο κρούσμα ήταν ήταν ένας ασθενής με πολλαπλά τραύματα που μεταφέρθηκε στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) νοσοκομείου της Ισπανίας από ιταλικό νοσοκομείο. Στην συνέχεια η KPC-3 *K. pneumoniae* εξαπλώθηκε και σε άλλους ασθενείς.(386) Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 KPC-3 *K. Pneumoniae* που ανήκε στον κλώνο ST512 βρέθηκε σε 2 νοσοκομεία στο Ciudad Real στην Ισπανία μεταξύ 2016 και 2019.(387)

Σύμφωνα με μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2016, στην Ισπανία μεταξύ 2012 και 2014 μελετήθηκαν εντεροβακτηριακά με καρβαπενεμάση KPC. Μεταξύ αυτών βρέθηκαν στελέχη *K. Pneumoniae* που ανήκαν στους κλώνους ST11, ST101 και ST1961 και είχαν καρβαπενεμάση KPC-2 και στελέχη που ανήκαν στους κλώνους ST512 και ST678 και είχαν KPC-3.(388)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021 μελετήθηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση σε ασθενείς σε νοσοκομείο στη Μπανγκόκ, στην Ταϊλάνδη από το 2015 έως το 2017. Η ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε ότι το *blaOXA-232* ήταν η πιο κυρίαρχη οικογένεια γονιδίων καρβαπενεμάσης και βρέθηκε σε 34 από τα 39 στελέχη *K. Pneumoniae*. Οι δύο πιο συνηθισμένοι τύποι αλληλουχίας (STs) που εντοπίστηκαν στην *K. pneumoniae* ήταν οι ST16 και ST231, από τους οποίους 12 απομονώσεις ST16 έφεραν *blaOXA-232* και *bla<sub>NDM-1</sub>*, ενώ σχεδόν όλα τα ST231 έφεραν μόνο *blaOXA-232*.(389)

Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 μελετήθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Σαανά στην Υεμένη από το 2015 έως το 2016 18 στελέχη *K. Pneumoniae* και βρέθηκε ότι

ανήκουν στους κλώνους ST23, ST15, ST395 και ST231. Ο ST23 που είχε καρβαπενεμάση NDM-1 θεωρείται ως ένας εξαιρετικά λοιμογόνος κλώνος που είναι ευρέως διαδεδομένος στην Ασία. Όσον αφορά τον κλώνο ST395 που είχε καρβαπενεμάση NDM-1, είχε προηγουμένως εμπλακεί στη διάδοση της OXA-48 στη Γαλλία, KPC-3 στην Ιταλία, και KPC-2 στην Κίνα. Ο κλώνος ST15 που είχε καρβαπενεμάση NDM-1 και ο ST231 που είχε καρβαπενεμάση OXA-232 έχουν ήδη περιγραφεί σε γειτονικές χώρες της Υεμένης τα τελευταία χρόνια, όπως η Σαουδική Αραβία και τα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα.(390)

Ο κλώνος ST231 είναι ο συνηθέστερος κλώνος *K. Pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάση OXA-232 στην Ινδία σύμφωνα με μελέτη του 2019. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι στην Ινδία από το 2013 έως το 2018 βρέθηκαν και οι κλώνοι ST14, ST147, ST16, ST43, ST395 και ST570. Όλοι οι κλώνοι είχαν παραλλαγές της OXA-48 καρβαπενεμάσης και συγκεκριμένα τις OXA-181 και OXA-232. Σε δύο στελέχη ο κλώνος ST147 μαζί με το γονίδιο *blaOXA48* είχε επίσης το *bla<sub>NDM-5</sub>*. Το *blaOXA-181* και το *bla<sub>NDM-5</sub>* είχαν αναφερθεί τα προηγούμενα χρόνια στις ΗΠΑ και τη Νότια Κορέα.(391)

Σύμφωνα με μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017, το 2015 απομονώθηκε από ένα τραύμα σε ασθενή που νοσηλευόταν σε μονάδα εντατικής θεραπείας στο Μπρουνέι Νταρουσαλάμ στην Ασία ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που ανήκε στον κλώνο ST231. Το στέλεχος αυτό είχε καρβαπενεμάση OXA-232.(392)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021 χαρακτηρίστηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάση σε μονάδα νεογνών στην Ινδία για 4 χρόνια από το 2013 έως το 2016. Βρέθηκε η παρουσία του γονιδίου *blaOXA-181* στους κλώνους ST14, ST15 και ST48 και γονιδίου *blaOXA-232* στους κλώνους ST14, ST23 και ST231. Αυτή η μελέτη ανέφερε επίσης τη συνύπαρξη και του γονιδίου *bla<sub>NDM-5</sub>* στον κλώνο ST14.(393)

Στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν NDM-1 καρβαπενεμάση έχουν βρεθεί στην Ινδία, στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη Σουηδία σύμφωνα με μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2012. Στα στελέχη αυτά η MLST έδειξε ότι ανήκαν στους κλώνους ST14, ST11, ST149, ST231 και ST147.(283)

Τρία στελέχη *Klebsiella pneumoniae* με καρβαπενεμάση KPC-2 που ανήκαν στον κλώνο ST39 και ήταν ανθεκτικά στην κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη απομονώθηκαν στην Ελλάδα από το 2019 έως το 2020 σύμφωνα με μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020.(394) Νοσοκομειακά κρούσματα που προκαλούνται από *K. pneumoniae* ST39 έχουν αναφερθεί σε νοσοκομείο της Γερμανίας. Η *K. pneumoniae* ST39 που ανιχνεύθηκε στη Γερμανία διέθετε και τα δύο γονίδια *bla<sub>KPC-2</sub>* και *bla<sub>NDM-1</sub>*.(395) Σποραδικές περιπτώσεις ST39 που παράγει KPC έχουν επίσης αναφερθεί στην Κίνα(396), ενώ στην Ισπανία και το Ισραήλ, ο ST39 έχει συσχετιστεί με VIM-1 και OXA-48 αντίστοιχα.(333,397)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2019 χαρακτηρίστηκαν επτά στελέχη KPC *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν σε ιδιωτικά εργαστήρια από μη νοσηλευόμενους ασθενείς (τέσσερα από την περιοχή της Θεσσαλονίκης και ένα από την Κατερίνη, την Κοζάνη και την Κέρκυρα) από το 2015 έως το 2017. Βρέθηκε ότι έξι στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST258 και ένα στον ST39. (398)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2014 έγινε η πρώτη αναφορά της *armA16Sr* RNA μεθύλασης σε 23 κλινικές απομονώσεις *K. pneumoniae* που παράγει ESBL σε Παιδιατρικές και Νεογνικές Μονάδες Εντατικής Θεραπείας σε νοσοκομεία της Αλγερίας από το 2010 έως το 2011. Η μελέτη αναφέρει 15 κλώνους *K. pneumoniae* που βρέθηκαν και επιπλέον εντοπίστηκε ο κλώνος ST39 σε στελέχη *K. pneumoniae* που έφεραν γονίδια ESBL και *armA*. Ένα στέλεχος ST39 που παράγει VIM έχει αναφερθεί επίσης σε νοσοκομειακό ξέσπασμα στην Ισπανία αλλά δεν συσχετίστηκε με *K. pneumoniae* που παράγει *armA*.(399)

Σε μονάδα νεογνών τριτοβάθμιου νοσοκομείου της Δυτικής Αφρικής το 2016, σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020, αναφέρθηκαν 49 επεισόδια νεογνικής βακτηριαμίας από *Burkholderia cepacia* και 45 επεισόδια βακτηριαμίας από *K. pneumoniae* που παράγει ESBL β-λακταμάση. Τα στελέχη *K pneumoniae* που βρέθηκαν ήταν ST39 και ST1535.(400)

Ο κλώνος ST39 έχει συνδεθεί με την εξάπλωση μιας επιδημίας OXA-48 σε μονάδα εντατικής θεραπείας νεογνών στην Ιερουσαλήμ, στο Ισραήλ το 2012. Μελετήθηκαν 29 στελέχη *K. Pneumoniae* και 2 στελέχη *Enterobacter cloacae* που κατείχαν τα γονίδια *bla<sub>OXA-48</sub>* και *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, τα οποία βρίσκονταν στο ίδιο πλασμίδιο. Αυτό το πλασμίδιο είναι παρόμοιο με αυτό που φιλοξενεί *bla<sub>OXA-48</sub>* και έχει πλέον αποκτήσει *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, οδηγώντας σε αντίσταση σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.(333)

Σε μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2022 βρέθηκαν στην Ελλάδα τρία στελέχη *K. pneumoniae* που ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες. Όλα έφεραν τα γονίδια *bla<sub>VIM-1</sub>* και *bla<sub>KPC-2</sub>* και ανήκαν στον κλώνο ST39. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά για την ανίχνευση στελεχών *K. pneumoniae* ST39 που παράγουν ταυτόχρονα VIM-1 και KPC-2.(401)

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές αναφορές στελεχών *K. pneumoniae* θετικά για το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* που ανήκουν στον κλώνο ST101. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στην Ισπανία την περίοδο 2010-2012 βρέθηκαν 28 καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* τα οποία ανήκαν στον κλώνο ST101 και έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>*.(402) Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ βρέθηκαν 4 στελέχη με καρβαπενεμάση OXA-48 σε διαφορετικούς ασθενείς. Οι 3 από τους 4 ασθενείς είχαν προηγούμενη νοσηλεία εκτός Ισραήλ (Ιορδανία και Γεωργία). Το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* εντοπίστηκε σε στελέχη εντεροβακτηριακών μεταξύ των οποίων υπήρχε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* ST101.(403) Επιπλέον, σε μία μελέτη που διεξήχθη το 2011-2013 στην Ρουμανία σε καρβαπενέμη ανθεκτικά στελέχη Εντεροβακτηριακών βρέθηκαν στελέχη ST101 *K. pneumoniae* θετικά για την παραγωγή



καρβαπενεμάσης OXA-48.(404) Στην Ιαπωνία μόνο δύο στελέχη *K. pneumoniae* ST101 OXA-48 θετικά είχαν βρεθεί μέχρι το 2013, τα οποία απομονώθηκαν από ασθενείς οι οποίοι είχαν ταξιδέψει προηγουμένως στην Τουρκία και νοσηλεύτηκαν στην Αίγυπτο, όπου και στις 2 χώρες έχει γίνει αναφορά για την παρουσία τέτοιων στελεχών.(337)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020 μελετήθηκαν στελέχη gram αρνητικών βακτηριδίων που συλλέχθηκαν από το 2013 μέχρι το 2015 σε τρεις πόλεις στη βορειοανατολική Αλγερία. Ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στην Αλγερία στελέχη *K. pneumoniae* του έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-48</sub>* και ανήκαν στους κλώνους ST404 και ST219. Η *K. pneumoniae* ST404 έχει αναφερθεί παλαιότερα στην Κορέα και η ST219 στη Βραζιλία.(405)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2021 εξετάστηκαν στελέχη *K. pneumoniae* που σχετίζονταν με σοβαρές λοιμώξεις στη ΜΕΘ στη Ρωσία. Οι κλώνοι που βρέθηκε ότι προκάλεσαν σοβαρές συστηματικές λοιμώξεις ήταν οι ST14, ST23, ST39, ST76, ST86, ST218, ST219, ST268 και ST2674. Στη μελέτη αυτή ο κλώνος ST219 έφερε γονίδιο ESBL, το *bla<sub>CTX-M</sub>*.(407)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2020 εξετάστηκαν στελέχη *K. pneumoniae* ανθεκτικά από νοσοκομεία και μονάδες επεξεργασίας λυμάτων στη Νότια Ρουμανία από το 2018 έως το 2019. Συνολικά 14 κλώνοι ταυτοποιήθηκαν στα στελέχη *K. pneumoniae* που αναλύθηκαν σε αυτή τη μελέτη και τα γονίδια καρβαπενεμάσης που είχαν ήταν τα *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* και *bla<sub>KPC-2</sub>*. Οι πιο διαδεδομένοι κλώνοι καρβαπενεμής ανθεκτικής *K. pneumoniae* ήταν οι ST101, ST219 σε κλινικά δείγματα και ST258, ST395 σε υδρόβιες απομονώσεις. Οι ST45 και ST485 συσχετίστηκαν αποκλειστικά με δείγματα από την εισροή εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, οι ST11, ST35, ST364 με δείγματα από την εκροή και ο ST1564 με κλινικά δείγματα. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε για πρώτη φορά την παρουσία *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσης ST35, ST219, ST364, ST395, ST485 και ST1878 στα λύματα.(406)

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2012 μελετήθηκαν 50 στελέχη εντεροβακτηριακών που παράγουν ESBL στο Παιδιατρικό Ογκολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Μπρνο στην Τσεχία από το 2009 μέχρι το 2010. Ο φαινότυπος ESBL προκλήθηκε από την παρουσία του γονιδίου *bla<sub>CTX-M-15</sub>* στα περισσότερα στελέχη. Από αυτά τα 36 ήταν *K. pneumoniae* και βρέθηκε με MLST ότι ανήκουν σε επτά κλώνους, τους ST280, ST321, ST323, ST416, ST626, ST627 και ST628.(408)

Σύμφωνα με μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2011, σε 40 ελληνικά νοσοκομεία από το 2009 έως το 2010 απομονώθηκαν 378 στελέχη *K. pneumoniae* KPC-2. Ο ST258 ήταν ο κυρίαρχος κλώνος και ακολουθούσαν οι ST147, ST383, ST133, ST274 και ST323. Παρατηρήθηκε ταυτόχρονη παραγωγή ενζύμων τύπου VIM σε στελέχη που ανήκαν στους κλώνους ST147, ST323 και ST383 (VIM-1, VIM-1 και VIM-4, αντίστοιχα).(409)

Στην Τσεχία, σύμφωνα με μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2017, βρέθηκε το 2011 στέλεχος *K. pneumoniae* με καρβαπενεμάση VIM που ανήκε στον κλώνο ST323. Το στέλεχος αυτό έφερε το ιντεγκρόνιο In110 που κωδικοποιεί την καρβαπενεμάση VIM-1 (*bla<sub>VIM-1</sub>-aacA4-aadA1*).<sup>(410)</sup>

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2018 απομονώθηκαν 53 στελέχη εντεροβακτηριακών ανθεκτικών στις καρβαπενέμες σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο στην επαρχία Χείλονγκτσιάνγκ στην Κίνα από το 2015 μέχρι το 2017. Βρέθηκαν 42 στελέχη με γονίδια *bla<sub>KPC</sub>*, τρία με γονίδια *bla<sub>NDM-1</sub>*, τρία με γονίδια *bla<sub>NDM-5</sub>*, ένα με γονίδιο *bla<sub>NDM-7</sub>* και έξι με γονίδια *bla<sub>IMP-4</sub>*. Τα περισσότερα στελέχη είχαν πολλαπλά γονίδια αντοχής. Ταυτόχρονα με τις καρβαπενεμάσες είχαν ESBL γονίδια (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* και *bla<sub>CTX-M-15</sub>*). Η MLST αποκάλυψε ότι ο ST76 ήταν ο επικρατέστερος κλώνος, ακολουθούμενος από τους ST896, ST323 και ST11. Επίσης ένα νέος κλώνος ο ST2946 ταυτοποιήθηκε από αυτή τη μελέτη. Στους κλώνους ST323 και ST11 ανήκαν στελέχη *K. pneumoniae* KPC-2.<sup>(411)</sup>

Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2022 εξετάστηκαν τα λύματα και τα νερά σε όλη την Ιρλανδία από το 2019 μέχρι το 2020 για την παρουσία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά *Enterobacteriales*. Συλλέχθηκαν 118 δείγματα νερού (30 L) και 36 δείγματα λυμάτων (200 mL). Τα νερά διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CarE και ακολούθησε εμπλουτισμός και καλλιέργεια. Τα στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν και παράγουν καρβαπενεμάση ανήκαν στους κλώνους ST323, ST17 και ST405.<sup>(412)</sup>

Συνύπαρξη καρβαπενεμασών KPC και VIM εμφανίστηκε το 2009 σε νοσοκομείο της Αθήνας σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* που είχε VIM-4 και KPC-2 ταυτόχρονα και ανήκε στον κλώνο ST383.<sup>(413)</sup>

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από την πολυανθεκτική *Klebsiella pneumoniae* (MDR-KP) επιβαρύνονται από υψηλή θνησιμότητα και συχνά συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανεπαρκούς αντιμικροβιακής θεραπείας. Τόσο σε ενδημικό όσο και σε επιδημικό πλαίσιο, ένας υψηλός κίνδυνος εξάπλωσης MDR-KP αναγνωρίζεται μεταξύ των θαλάμων και μεταξύ διαφορετικών νοσοκομείων. Συνιστώνται διάφορα μέτρα ελέγχου λοιμώξεων και αντιμικροβιακής διαχείρισης για τον περιορισμό της εξάπλωσης της MDR-KP, συμπεριλαμβανομένων των προγραμμάτων ASC-active screening cultures σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, της εφαρμογής υγιεινής χειρών (HH-hand hygiene), της εφαρμογής προφυλακτικών μέτρων επαφής (CP-contact precaution), της απομόνωσης του ασθενούς, εκπαιδευτικών προγραμμάτων και περιορισμό της υπερβολικής χρήσης αντιμικροβιακών, ειδικά των καρβαπενεμών. Επαρκή δεδομένα υποστηρίζουν τη χρήση νέων φαρμάκων, όπως η κεφταζιδίμη-αβιμπακτάμη στη θεραπεία αυτών των λοιμώξεων. Τα φάρμακα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμένα αντιβιοτικά σχήματα. Η αντοχή στις καρβαπενέμες στην *K. pneumoniae* μπορεί να προκύψει είτε από έκφραση μίας καρβαπενεμάσης είτε από συνδυασμό καρβαπενεμασών όπως έδειξε η συγκεκριμένη εργασία. Για τον καθορισμό των ανθεκτικών στελεχών μελετώνται διάφορα γονίδια όπως τα *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* και *bla<sub>NDM</sub>*. Η περαιτέρω έρευνα ανθεκτικών γονιδίων είναι σημαντικό να συνεχίζεται.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*. 2018 Dec 5;20(6):13.
2. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 May 1;41(3):252–75.
3. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y, ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar;52(3):813–21.
4. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun;30(2):313–22.
5. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2010 Sep;74(3):417–33.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Mar;18(3):268–81.
7. Hersh AL, Newland JG, Beekmann SE, Polgreen PM, Gilbert DN. Unmet medical need in infectious diseases. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012 Jun;54(11):1677–8.
8. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):736–55.
9. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Jan 1;48(1):1–12.
10. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Mar;11(3):297–308.
11. de Man TJB, Lutgring JD, Lonsway DR, Anderson KF, Kiehlbauch JA, Chen L, et al. Genomic Analysis of a Pan-Resistant Isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States 2016. *mBio*. 2018 Apr 3;9(2):e00440-18.
12. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D566–73.
13. D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011 Aug 31;477(7365):457–61.

14. Nesme J, Cécillon S, Delmont TO, Monier JM, Vogel TM, Simonet P. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol CB*. 2014 Dec 19;24(10):1096–100.
15. Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Aug;70(8):2276–80.
16. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Dec;12(5):371–87.
17. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 7;112(27):E3574-3581.
18. World Health Organization. World Health Organization. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. Geneva, Switzerland. 2009.
19. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Tracking CRE. CDC. 2017;2010:2009–10. 2017;
20. ECDC. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2020 data. 2020; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Surveillance-antimicrobial-resistance-in-Europe-2020.pdf>
21. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct;59(10):5873–84.
22. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017 May 19;8(4):460–9.
23. ΙΩΑΝΝΗΣ Κ. ΠΑΠΑΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ-ΔΑΛΑΪΝΑ. ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΙΟΛΟΓΙΑ. UNIVERSITY STUDIO PRESS; 2008.
24. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Klebsiella\\_pneumoniae\\_pathogenesis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Klebsiella_pneumoniae_pathogenesis). Available from: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Klebsiella\\_pneumoniae\\_pathogenesis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Klebsiella_pneumoniae_pathogenesis)
25. Hussein JD J, Hamed S. Comparison of Three Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Klebsiella Pneumoniae*. *JGPT*. 2019 Apr;
26. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167–202.
27. Osborn MJ, Gander JE, Parisi E, Carson J. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J Biol Chem*. 1972 Jun 25;247(12):3962–72.

28. Osborn MJ. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem.* 1969;38:501–38.
29. Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 1972 Dec;36(4):407–77.
30. Neidhardt F, Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* Washington: ASM Press; 1996.
31. Lugtenberg B, Van Alphen L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Mar 21;737(1):51–115.
32. Ghuysen J-M, Hakenbeck R. Bacterial Cell Wall. In *ELSEVIER*; 1994.
33. Jann K, Jann B. The K antigens of *Escherichia coli*. *Prog Allergy.* 1983;33:53–79.
34. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 1992 Jul;38(7):699–704.
35. Stürchler D. *Klebsiella* and Klebs the person behind the name. *Travel Med Infect Dis.* 2016 Dec;14(6):654.
36. Lenis A, Ruff T, Diaz JA, Ghandour EG. Rhinoscleroma. *South Med J.* 1988 Dec;81(12):1580–2.
37. Goldstein EJ, Lewis RP, Martin WJ, Edelstein PH. Infections caused by *Klebsiella ozaenae*: a changing disease spectrum. *J Clin Microbiol.* 1978 Oct;8(4):413–8.
38. Tang LM, Chen ST. *Klebsiella ozaenae* meningitis: report of two cases and review of the literature. *Infection.* 1994 Feb;22(1):58–61.
39. Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, Tsai FC, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol.* 2008 Jul;46(7):2231–40.
40. Lin YT, Jeng YY, Chen TL, Fung CP. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. *BMC Infect Dis.* 2010 Oct 25;10:307.
41. Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun.* 1983 Apr;40(1):56–61.
42. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Sep;62(1):1–6.
43. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2016 Sep;80(3):629–61.

44. Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, et al. Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun*. 1993 Oct;61(10):4208–16.
45. Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect Immun*. 1989 Feb;57(2):546–52.
46. Wacharotayankun R, Arakawa Y, Ohta M, Tanaka K, Akashi T, Mori M, et al. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by RmpA2, which shows homology to NtrC and FixJ. *Infect Immun*. 1993 Aug;61(8):3164–74.
47. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep*. 2015 Oct 23;5:15573.
48. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, von Gottberg A, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul;13(7):986–93.
49. Highsmith AK, Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect Control IC*. 1985 Feb;6(2):75–7.
50. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*. 1992 Apr;36(4):250–4.
51. Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J Med Microbiol*. 1986 Mar;21(2):133–7.
52. Ofek I, Doyle R J. *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*. London, United Kingdom: Chapman & Hall, Ltd.; 1994.
53. Huang YJ, Liao HW, Wu CC, Peng HL. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol*. 2009 Feb;160(1):71–9.
54. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):2266–73.
55. Darfeuille-Michaud A, Jallat C, Aubel D, Sirot D, Rich C, Sirot J, et al. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun*. 1992 Jan;60(1):44–55.
56. Favre-Bonte S, Darfeuille-Michaud A, Forestier C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect Immun*. 1995 Apr;63(4):1318–28.
57. Raetz CRH. A remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (2nd edition). Washington, USA: ASM Press;

p. 1035–63.

58. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genomics*. 2016 Aug;2(8):e000073.
59. Ciurana B, Tomás JM. Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. *Infect Immun*. 1987 Nov;55(11):2741–6.
60. Jiang GZ, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Yokochi T. Binding of mannose-binding protein to *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide possessing the mannose homopolysaccharide as the O-specific polysaccharide and its relation to complement activation. *Infect Immun*. 1995 Jul;63(7):2537–40.
61. Neth O, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):688–93.
62. Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control IC*. 1985 Feb;6(2):52–8.
63. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*. 1992 Jun;60(6):2529–35.
64. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257.
65. Albertí S, Alvarez D, Merino S, Casado MT, Vivanco F, Tomás JM, et al. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1996 Nov;64(11):4726–32.
66. Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, Rosenberg JK, Whitfield C, Bender RA, et al. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1423–30.
67. Albertí S, Marqués G, Camprubí S, Merino S, Tomás JM, Vivanco F, et al. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect Immun*. 1993 Mar;61(3):852–60.
68. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Dec;59(5):2909–13.
69. Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 17;106(7):2348–52.
70. Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Iron binding proteins and infection. *Br J Haematol*. 1972 Oct;23(4):389–92.



71. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect.* 2001 Jun;3(7):561–9.
72. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2007 Sep;71(3):413–51.
73. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *mBio.* 2012 Nov 20;3(6):e00224-11.
74. Brock JH, Williams PH, Licéaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun.* 1991 Sep;59(9):3185–90.
75. Perry RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, DeMoll E. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiol Read Engl.* 1999 Dec;145 ( Pt 5):1181–90.
76. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2014 Jun;82(6):2356–67.
77. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, et al. Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* 2008 Jul 25;4(7):e1000141.
78. Bi D, Jiang X, Sheng ZK, Ngmenterebo D, Tai C, Wang M, et al. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a ‘resistance-disarmed’ model organism. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct;70(10):2770–4.
79. Chen N, Ou HY, van Aartsen JJ, Jiang X, Li M, Yang Z, et al. The pheV phenylalanine tRNA gene *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates is an integration hotspot for possible niche-adaptation genomic islands. *Curr Microbiol.* 2010 Mar;60(3):210–6.
80. Zhang J, van Aartsen JJ, Jiang X, Shao Y, Tai C, He X, et al. Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *J Microbiol Methods.* 2011 Feb;84(2):283–9.
81. van Aartsen JJ, Stahlhut SG, Harrison EM, Crosatti M, Ou HY, Krogfelt KA, et al. Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* 2012 Apr 20;12:59.
82. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:4.

83. Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Aug 29;9(8):815–20.
84. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3396–406.
85. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969–76.
86. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Mar;41(3):563–9.
87. García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, et al. An ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4178–84.
88. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofield S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):654–8.
89. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le T a. H, Cao V, Ngandjio A, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Apr;19(4):349–55.
90. van der Bij AK, Pitout JDD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Sep;67(9):2090–100.
91. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1584–90.
92. Pournaras S, Ikonmidis A, Tzouveleki LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5153–6.

93. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jul;39(7):1612–5.
94. Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Dec;47(5):1522–8.
95. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):15–22.
96. Sutherland R. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: problems and solutions. *Prog Drug Res Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech Pharm.* 1993;41:95–149.
97. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Nov;33(11):1831–6.
98. Sanders CC, Sanders WE. beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1992 Nov;15(5):824–39.
99. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988 Aug;10(4):677–8.
100. Kirby WM. EXTRACTION OF A HIGHLY POTENT PENICILLIN INACTIVATOR FROM PENICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *Science.* 1944 Jun 2;99(2579):452–3.
101. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 1973;9:31–88.
102. Richmond MH. Resistance factors and their ecological importance to bacteria and to man. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1973;13:191–248.
103. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 Dec 16;289(1036):321–31.
104. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1211–33.
105. De Angelis G, Del Giacomo P, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of  $\beta$ -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 18;21(14):E5090.
106. Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2321–4.

107. Petrova A, Feodorova Y, Miteva-Katrandzhieva T, Petrov M, Murdjeva M. First detected OXA-50 carbapenem-resistant clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* from Bulgaria and interplay between the expression of main efflux pumps, OprD and intrinsic AmpC. *J Med Microbiol.* 2019 Dec;68(12):1723–31.
108. Takebayashi Y, Findlay J, Heesom KJ, Warburton PJ, Avison MB, Evans BA. Variability in carbapenemase activity of intrinsic OxaAb (OXA-51-like)  $\beta$ -lactamase enzymes in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Feb 11;76(3):587–95.
109. Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1330–5.
110. Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):348–51.
111. Quinteira S, Ferreira H, Peixe L. First isolation of blaVIM-2 in an environmental isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Dec;49(5):2140–1.
112. Harmon DE, Miranda OA, McCarley A, Eshaghian M, Carlson N, Ruiz C. Prevalence and characterization of carbapenem-resistant bacteria in water bodies in the Los Angeles-Southern California area. *MicrobiologyOpen.* 2019 Apr;8(4):e00692.
113. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440–58, table of contents.
114. Frère JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jun;55(6):1051–3.
115. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O’Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Sep;40(9):2080–6.
116. Medeiros AA, Hare RS. Beta-lactamase mediated resistance to penems and carbapenems amongst Enterobacteriaceae, in “Program and Abstracts of the Twenty-Sixth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1986, New Orleans, La.” Abstract 116, p. 117. American Society for Microbiology, Washington, DC. (1986).
117. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Dec;34(5):755–8.
118. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991 Jan;35(1):147–51.
119. 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

Feb;2(2):81–7.

120. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother.* 1995 Sep;36(3):585–6.
121. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151–61.
122. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012 Dec;18(5):263–72.
123. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Dec;37(5):939–46.
124. Naas T, Vandel 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 Jun;38(6):1262–70.
125. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001 Feb;39(2):125–7.
126. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct;50(10):3485–7.
127. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC, et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Nov;44(11):3035–9.
128. Troillet N, Carmeli Y, Venkataraman L, DeGirolami P, Samore MH. Epidemiological analysis of imipenem-resistant *Serratia marcescens* in hospitalized patients. *J Hosp Infect.* 1999 Dec;42(1):37–43.
129. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):999–1002.
130. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, et al. First class A carbapenemase isolated from *enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):1068–9.
131. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005 Feb;11(2):260–4.
132. Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of blaIMI-2 in an

- Enterobacter cloacae clinical isolate from China. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Apr;50(4):1610–1.
133. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb;49(2):776–8.
134. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland ES, Lockhart TJ, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an Enterobacter sp. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Nov;48(11):4438–40.
135. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a Salmonella clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Apr;47(4):1297–300.
136. Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Palepou MFI, Ward E, et al. Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Dec;48(12):4793–9.
137. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a Klebsiella pneumoniae isolate from France. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Oct;49(10):4423–4.
138. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, et al. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in Pseudomonas aeruginosa isolates from Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jan;50(1):226–9.
139. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant Escherichia coli clones in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep;50(9):3098–101.
140. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):763–5.
141. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1791–8.
142. 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 Sep;44(9):2247–53.
143. 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 Mar;44(3):622–32.
144. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Mar;49(3):561–5.
145. Jeong SH, Bae IK, Kim D, Hong SG, Song JS, Lee JH, et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov;49(11):4809–10.
146. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2005 Nov;11 Suppl 6:2–9.
147. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005 Apr;18(2):306–25.
148. Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J*. 1967 Jun;103(3):27C–30C.
149. Lim HM, Pène JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol*. 1988 Jun;170(6):2873–8.
150. Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Jan;34(1):44–51.
151. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982 Oct;22(4):564–70.
152. Concha NO, Rasmussen BA, Bush K, Herzberg O. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Struct Lond Engl* 1993. 1996 Jul 15;4(7):823–36.
153. Yang Y, Rasmussen BA, Bush K. Biochemical characterization of the metallo-beta-lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Dec;36(5):1155–7.
154. Bandoh K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1992 Apr;45(4):542–7.
155. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jan;35(1):147–51.
156. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Aug;42(8):2006–11.
157. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated

dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Apr;39(4):824–9.

158. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec;34(12):2909–13.

159. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(5):1229–35.

160. Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jun;50(6):2272–3.

161. Peleg AY, Franklin C, Bell J, Spelman DW. Emergence of IMP-4 metallo-beta-lactamase in a clinical isolate from Australia. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Sep;54(3):699–700.

162. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Jun;8(6):321–31.

163. Marra AR, Pereira CAP, Gales AC, Menezes LC, Cal RGR, de Souza JMA, et al. Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan;50(1):388–90.

164. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1406–9.

165. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Dec;56(6):1148–51.

166. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec;48(12):4654–61.

167. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov;49(11):4485–91.

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



2000 Apr;44(4):891–7.

169. Protonotariou E, Tsalidou M, Vitti D, Kalogeridis A, Sofianou D. First identification of VIM-1-producing *Citrobacter freundii* in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Nov;32(5):460–1.

170. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3893–6.

171. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, et al. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Apr;46(4):1053–8.

172. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan;47(1):395–7.

173. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Dec;46(12):4026–8.

174. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1290–2.

175. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. 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*. 2001 Aug;45(8):2224–8.

176. Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb;63(2):269–73.

177. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5046–54.

178. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011 Apr;66(4):689–92.

179. 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 Sep;10(9):597–602.

180. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791–8.
181. Matthew M. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother*. 1979 Jul;5(4):349–58.
182. Medeiros AA. Beta-lactamases. *Br Med Bull*. 1984 Jan;40(1):18–27.
183. Simpson IN, Harper PB, O’Callaghan CH. Principal beta-lactamases responsible for resistance to beta-lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980 Jun;17(6):929–36.
184. Bush K. Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. *Rev Infect Dis*. 1988 Aug;10(4):681–90.
185. Bush S, Sykes R. B. Characterization and epidemiology of  $\beta$ -lactamases. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Science Publishers BV; 1987.
186. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr Pharm Des*. 1999 Nov;5(11):865–79.
187. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1369–73.
188. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(5):2420–3.
189. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):143–4.
190. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT, Araj GF, Matar GM. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010 Jun;104(4):327–30.
191. Poirel L, Ros A, Carrër A, Fortineau N, Carricajo A, Berthelot P, et al. Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec;66(5):1181–2.
192. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1274–8.
193. Kalpoe JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type  $\beta$ -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J Med Microbiol*. 2011 Dec;60(Pt 5):677–8.

194. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008 Apr 15;197(8):1079–81.
195. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 [Internet]. 2013. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
196. Walters MS, Witwer M, Lee YK, Albrecht V, Lonsway D, Rasheed JK, et al. Notes from the Field: Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Less Common Enterobacteriaceae Genera - United States, 2014-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018 Jun 15;67(23):668–9.
197. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Nov;29(11):996–1011.
198. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jan;34(1):1–14.
199. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016 Nov;37(11):1288–301.
200. Cai B, Echols R, Magee G, Arjona Ferreira JC, Morgan G, Ariyasu M, et al. Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(3):ofx176.
201. Frost I, Van Boeckel TP, Pires J, Craig J, Laxminarayan R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: the role of international travel. *J Travel Med.* 2019 Dec 23;26(8):taz036.
202. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci Basel Switz.* 2017 Dec 21;6(1):E1.
203. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017 Feb 15;215(suppl\_1):S28–36.
204. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, 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 Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Feb 1;50(3):364–73.
205. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther*. 2021 Mar;10(1):75–92.
206. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, et al. An Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the ‘Perfect Storm’. *J Infect Dis*. 2017 Dec 27;217(1):82–92.
207. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1597–606.
208. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):130–6.
209. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, et al. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the ‘menace’ arrives in the new world. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):680–3.
210. Ahlstrom CA, Ramey AM, Woksepp H, Bonnedahl J. Repeated Detection of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* in Gulls Inhabiting Alaska. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Aug;63(8):e00758-19.
211. Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;24(12):1241–50.
212. Mahon BM, Brehony C, McGrath E, Killeen J, Cormican M, Hickey P, et al. Indistinguishable NDM-producing *Escherichia coli* isolated from recreational waters, sewage, and a clinical specimen in Ireland, 2016 to 2017. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2017 Apr 13;22(15):30513.
213. Mani Y, Mansour W, Mammeri H, Denamur E, Saras E, Boujâafar N, et al. KPC-3-producing ST167 *Escherichia coli* from mussels bought at a retail market in Tunisia. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2403–4.
214. de Araujo CFM, Silva DM, Carneiro MT, Ribeiro S, Fontana-Maurell M, Alvarez P, et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jul;60(7):4380–3.

215. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: detection of a verona integron-encoded metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* --- United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010 Sep 24;59(37):1212.
216. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Jan;38(1):71–8.
217. Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF, Zhu W, Kitchel B, Watz N, et al. IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4239–45.
218. Παπανικολάου Γ., Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε., Κατσίλα Θ., Τσαρούχα Χ., Τζέτη Μ., et al. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ [Internet]. Kallipos, Open Academic Editions; 2015. Available from: <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/641>
219. Vasileiadou K, Papakostas S, Triantafyllidis A, Kappas I, Abatzopoulos TJ. A Multiplex PCR Method for Rapid Identification of *Brachionus Rotifers*. *Mar Biotechnol.* 2009 Feb 1;11(1):53–61.
220. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect.* 1998 Feb;38(2):119–32.
221. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000prime Rep.* 2014;6:64.
222. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2012 Nov;12(11):881–7.
223. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Dec;10(12):1393–404.
224. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Treccarichi EM, Posteraro B, Fiori B, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):1987–94.
225. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2001 Apr 15;32(8):1162–71.
226. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, et al.

- Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. *Medicine (Baltimore)*. 2014 Oct;93(17):298–309.
227. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013 Dec;56(9):1310–8.
228. Morrissey I, Hackel M, Badal R, Bouchillon S, Hawser S, Biedenbach D. A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. *Pharm Basel Switz*. 2013 Nov 1;6(11):1335–46.
229. van Duijn PJ, Dautzenberg MJD, Oostdijk EAN. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care*. 2011 Dec;17(6):658–65.
230. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):682–707.
231. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Oct;16(10):749–61.
232. Perez F, Villegas MV. The role of surveillance systems in confronting the global crisis of antibiotic-resistant bacteria. *Curr Opin Infect Dis*. 2015 Aug;28(4):375–83.
233. Feil EJ. Enterobacteriaceae: joining the dots with pan-European epidemiology. *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb;17(2):118–9.
234. Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, Milstone AM. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(1):95–108.
235. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep;13(9):785–96.
236. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;20(9):821–30.
237. Kaiser RM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K. pneumoniae* in US hospitals: report from the 2007–2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):356–60.
238. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Dec;62(6):1257–60.

239. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2012 Feb 16;17(7):20088.
240. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr;9(4):228–36.
241. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):6344–7.
242. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *J Infect*. 2016 Feb;72(2):152–60.
243. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R, et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2013 Dec 30;18(22):20489.
244. Li H, Zhang J, Liu Y, Zheng R, Chen H, Wang X, et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China from 2008 to 2011: predominance of KPC-2 enzyme. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan;78(1):63–5.
245. Tseng IL, Liu YM, Wang SJ, Yeh HY, Hsieh CL, Lu HL, et al. Emergence of Carbapenemase Producing *Klebsiella Pneumonia* and Spread of KPC-2 and KPC-17 in Taiwan: A Nationwide Study from 2011 to 2013. *PloS One*. 2015;10(9):e0138471.
246. Shanmugam P, Meenakshisundaram J, Jayaraman P. blaKPC gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2013 Dec;7(12):2736–8.
247. Yoo JS, Kim HM, Yoo JI, Yang JW, Kim HS, Chung GT, et al. Detection of clonal KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Korea during nationwide surveillance in 2011. *J Med Microbiol*. 2013 Sep;62(Pt 9):1338–42.
248. Partridge SR, Ginn AN, Wiklendt AM, Ellem J, Wong JSJ, Ingram P, et al. Emergence of blaKPC carbapenemase genes in Australia. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Feb;45(2):130–6.
249. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*. 2014 Dec;22(12):686–96.
250. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PloS One*. 2015;10(7):e0133727.

251. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Feb;66(2):307–12.
252. Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Luo Y, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Nov;19(11):E509-515.
253. Saito R, Takahashi R, Sawabe E, Koyano S, Takahashi Y, Shima M, et al. First report of KPC-2 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(5):2961–3.
254. Pesesky MW, Hussain T, Wallace M, Wang B, Andleeb S, Burnham CAD, et al. KPC and NDM-1 genes in related Enterobacteriaceae strains and plasmids from Pakistan and the United States. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jun;21(6):1034–7.
255. Nobari S, Shahcheraghi F, Rahmati Ghezlegh F, Valizadeh B. Molecular characterization of carbapenem-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Iranian patients: first identification of blaKPC gene in Iran. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2014 Aug;20(4):285–93.
256. Sonnevend Á, Ghazawi A, Darwish D, AlDeesi Z, Kadhum AF, Pál T. Characterization of KPC-type carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in the Arabian Peninsula. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Dec;70(5):1592–3.
257. Sonnevend Á, Ghazawi AA, Hashmey R, Jamal W, Rotimi VO, Shibl AM, et al. Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae with High Rate of Autochthonous Transmission in the Arabian Peninsula. *PloS One.* 2015;10(6):e0131372.
258. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog.* 2012 Jul 16;4(1):7.
259. Perilli M, Bottoni C, Grimaldi A, Segatore B, Celenza G, Mariani M, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Feb;75(2):218–21.
260. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De La Cadena E, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Coharboring KPC and VIM Carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):1101–2.
261. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2015 Apr;21(2):234–6.
262. Hu L, Zhong Q, Shang Y, Wang H, Ning C, Li Y, et al. The prevalence of



- carbapenemase genes and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from five teaching hospitals in central China. *Epidemiol Infect.* 2014 Sep;142(9):1972–7.
263. Dong D, Liu W, Li H, Wang Y, Li X, Zou D, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China. *Front Microbiol.* 2015;6:519.
264. Liu Y, Wan LG, Deng Q, Cao XW, Yu Y, Xu QF. First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol Infect.* 2015 Jan;143(2):376–84.
265. Leung V, Loo VG, Frenette C, Domingo MC, Bourgault AM, Mulvey MR, et al. First Canadian outbreak of Enterobacteriaceae-expressing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 3. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicale.* 2012;23(3):117–20.
266. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, et al. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):4048–50.
267. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 29;16(5):9654–92.
268. Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, et al. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2014 Dec 22;19(20):20809.
269. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011 Dec;19(12):588–95.
270. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, et al. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerg Infect Dis.* 2013 Jun;19(6):870–8.
271. Doi Y, O'Hara JA, Lando JF, Querry AM, Townsend BM, Pasculle AW, et al. Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jan;20(1):163–5.
272. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):103–6.
273. Borgia S, Lastovetska O, Richardson D, Eshaghi A, Xiong J, Chung C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae containing blaNDM-1, Ontario, Canada. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012 Dec;55(11):e109-117.

274. Lowe CF, Kus JV, Salt N, Callery S, Louie L, Khan MA, et al. Nosocomial transmission of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013 Jan;34(1):49–55.
275. Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1957–60.
276. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, et al. A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan;60(1):332–42.
277. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Aug;46(2):169–73.
278. Arpin C, Noury P, Boraud D, Coulange L, Manetti A, André C, et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Jun;56(6):3432–4.
279. Robert J, Pantel A, Mérens A, Lavigne JP, Nicolas-Chanoine MH, ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group. Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Oct;69(10):2706–12.
280. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Aug;66(8):1730–3.
281. Spyropoulou A, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, et al. The first NDM metallo- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a University Hospital of Southwestern Greece. *J Chemother Florence Italy*. 2016 Aug;28(4):350–1.
282. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Cordovana M, Farruggia P, Panico M, et al. Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2011 Nov 24;16(47):20027.
283. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(5):2735–8.
284. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al.

- The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug;69(8):2091–7.
285. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(5):2929–33.
286. Kilic A, Baysallar M. The First *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015 Dec;35(3):382–3.
287. Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2781–3.
288. Barguigua A, El Otmani F, Lakbakbi El Yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2013 Jul;121(7):675–7.
289. Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, et al. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):525–7.
290. de Jager P, Chirwa T, Naidoo S, Perovic O, Thomas J. Nosocomial Outbreak of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-1-Producing Gram-Negative Bacteria in South Africa: A Case-Control Study. *PloS One.* 2015;10(4):e0123337.
291. Chen YT, Lin AC, Siu LK, Koh TH. Sequence of closely related plasmids encoding bla(NDM-1) in two unrelated *Klebsiella pneumoniae* isolates in Singapore. *PloS One.* 2012;7(11):e48737.
292. Balm MND, La MV, Krishnan P, Jureen R, Lin RTP, Teo JWP. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Sep;19(9):E421-423.
293. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, Tan KY, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015;4:26.
294. Shibl A, Al-Agamy M, Memish Z, Senok A, Khader SA, Assiri A. The emergence of OXA-48- and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2013 Dec;17(12):e1130-1133.
295. Zowawi HM, Sartor AL, Balkhy HH, Walsh TR, Al Johani SM, AlJindan RY, et al. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: dominance of OXA-48 and NDM producers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun;58(6):3085–90.
296. Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing

- Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Feb;66(2):304–6.
297. Sonnevend A, Al Baloushi A, Ghazawi A, Hashmey R, Girgis S, Hamadeh MB, et al. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol.* 2013 Jul;62(Pt 7):1044–50.
298. Dash N, Panigrahi D, Zarouni MA, Darwish D, Ghazawi A, Sonnevend A, et al. High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2014 Feb;20(1):52–6.
299. Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ, Khodakhast F, Udo EE, Poirel L. Emergence of nosocomial New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Feb;39(2):183–4.
300. Qin S, Fu Y, Zhang Q, Qi H, Wen JG, Xu H, et al. High incidence and endemic spread of NDM-1-positive Enterobacteriaceae in Henan Province, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4275–82.
301. Jin Y, Shao C, Li J, Fan H, Bai Y, Wang Y. Outbreak of multidrug resistant NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from a neonatal unit in Shandong Province, China. *PloS One.* 2015;10(3):e0119571.
302. Yamamoto T, Takano T, Fusegawa T, Shibuya T, Hung WC, Higuchi W, et al. Electron microscopic structures, serum resistance, and plasmid restructuring of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)-producing ST42 *Klebsiella pneumoniae* emerging in Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2013 Feb;19(1):118–27.
303. Nakano R, Nakano A, Hikosaka K, Kawakami S, Matsunaga N, Asahara M, et al. First report of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-5-producing *Escherichia coli* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7611–2.
304. Chiu SK, Wu TL, Chuang YC, Lin JC, Fung CP, Lu PL, et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PloS One.* 2013;8(7):e69428.
305. Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, et al. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1433–6.
306. Cho SY, Huh HJ, Baek JY, Chung NY, Ryu JG, Ki CS, et al. *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-5 and OXA-181 carbapenemases, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jun;21(6):1088–9.
307. Shoma S, Kamruzzaman M, Ginn AN, Iredell JR, Partridge SR. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying blaNDM-1. *Diagn*

Microbiol Infect Dis. 2014 Jan;78(1):93–7.

308. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic Characteristics of NDM-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Australia and Their blaNDM Genetic Contexts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan;60(1):136–41.
309. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011 Mar;11(3):164.
310. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed Res Int.* 2014;2014:249856.
311. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Fuller J, Rubin JE, Pitout JDD. Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec;52(5):1575–81.
312. Al-Marzooq F, Ngeow YF, Tay ST. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing dual carbapenemases (NDM-1 and OXA-232) and 16S rRNA methylase (armA) isolated from a Malaysian patient returning from India. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Apr;45(4):445–6.
313. Chen Z, Wang Y, Tian L, Zhu X, Li L, Zhang B, et al. First report in China of Enterobacteriaceae clinical isolates coharboring blaNDM-1 and blaIMP-4 drug resistance genes. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2015 Apr;21(2):167–70.
314. Sattar H, Toleman M, Nahid F, Zahra R. Co-existence of blaNDM-1 and blaKPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Pakistan. *J Chemother Florence Italy.* 2016 Aug;28(4):346–9.
315. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Sep;44(3):260–2.
316. Sidjabat HE, Townell N, Nimmo GR, George NM, Robson J, Vohra R, et al. Dominance of IMP-4-producing enterobacter cloacae among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jul;59(7):4059–66.
317. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007 Oct;2(5):501–12.
318. Evans BA, Amyes SGB. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):241–63.
319. Liapis E, Pantel A, Robert J, Nicolas-Chanoine MH, Cavalié L, van der Mee-Marquet N, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Dec;20(12):O1121–1123.
320. Semin-Pelletier B, Cazet L, Bourigault C, Juvin ME, Boutoille D, Raffi F, et al. Challenges of controlling a large outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French university hospital. *J Hosp Infect.* 2015 Apr;89(4):248–53.

321. Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Dec;43(5):460–4.
322. Giani T, Conte V, Mandalà S, D'Andrea MM, Luzzaro F, Conaldi PG, et al. Cross-infection of solid organ transplant recipients by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate producing the OXA-48 carbapenemase, likely derived from a multiorgan donor. *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2702–5.
323. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3463–4.
324. Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, et al. Copy Number Change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *PloS One*. 2013;8(4):e62774.
325. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, van der Zee A, van Burgh S, de Greeff SC, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2014 Mar 6;19(9):20723.
326. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1660–5.
327. Thomas CP, Moore LSP, Elamin N, Doumith M, Zhang J, Maharjan S, et al. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Dec;42(6):531–6.
328. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Apr;56(4):2125–8.
329. Kola A, Piening B, Pape UF, Veltzke-Schlieker W, Kaase M, Geffers C, et al. An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48 - producing *Klebsiella pneumoniae* associated to duodenoscopy. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015;4:8.
330. Potron A, Schrenzel J, Poirel L, Renzi G, Cherkaoui A, Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Dec;40(6):563–4.
331. Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum

cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):2546–51.

332. Beyrouthy R, Robin F, Dabboussi F, Mallat H, Hamzé M, Bonnet R. Carbapenemase and virulence factors of Enterobacteriaceae in North Lebanon between 2008 and 2012: evolution via endemic spread of OXA-48. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Oct;69(10):2699–705.

333. Adler A, Solter E, Masarwa S, Miller-Roll T, Abu-Libdeh B, Khammash H, et al. Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol.* 2013 Sep;51(9):2926–30.

334. Adler A, Hussein O, Ben-David D, Masarwa S, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, et al. Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan;70(1):89–92.

335. Poirel L, Carbonnelle E, Bernabeu S, Gutmann L, Rotimi V, Nordmann P. Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Aug;67(8):2051–2.

336. Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, Toyama M, Matsui M, Shibayama K, et al. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(1):79–81.

337. Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, Kirikae T. Isolation of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an overseas traveler returning to Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(2):120–1.

338. Ellis C, Chung C, Tijet N, Patel SN, Desjardins M, Melano RG, et al. OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Ottawa, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Jul;76(3):399–400.

339. Wrenn C, O'Brien D, Keating D, Roche C, Rose L, Ronayne A, et al. Investigation of the first outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *J Hosp Infect.* 2014 Dec;87(1):41–6.

340. Izdebski R, Bojarska K, Baraniak A, Literacka E, Herda M, Żabicka D, et al. NDM-1- or OXA-48-producing Enterobacteriaceae colonising Polish tourists following a terrorist attack in Tunis, March 2015. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2015 Jun 11;20(23):21150.

341. Jánvári L, Damjanova I, Lázár A, Rácz K, Kocsis B, Urbán E, et al. Emergence of OXA-162-producing *Klebsiella pneumoniae* in Hungary. *Scand J Infect Dis.* 2014 Apr;46(4):320–4.

342. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an

- ST11 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):84–8.
343. Lixandru BE, Cotar AI, Straut M, Usein CR, Cristea D, Ciontea S, et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Romania: A Six-Month Survey. *PloS One.* 2015;10(11):e0143214.
344. Markovska R, Stoeva T, Schneider I, Boyanova L, Popova V, Dacheva D, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2015 Oct;123(10):887–94.
345. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012 Dec;67(12):2860–4.
346. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, et al. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015 Nov 2;14:46.
347. Cuzon G, Bentchouala C, Vogel A, Héry M, Lezzar A, Smati F, et al. First outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Dec;46(6):725–7.
348. Ahn C, Butt AA, Rivera JI, Yaqoob M, Hag S, Khalil A, et al. OXA-48-producing Enterobacteriaceae causing bacteremia, United Arab Emirates. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2015 Jan;30:36–7.
349. Azimi L, Nordmann P, Lari AR, Bonnin RA. First report of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Iran. *GMS Hyg Infect Control.* 2014;9(1):Doc07.
350. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, et al. Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol.* 2013 Jan;51(1):369–72.
351. Ma L, Wang JT, Wu TL, Siu LK, Chuang YC, Lin JC, et al. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PloS One.* 2015;10(9):e0139152.
352. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, Tan KY, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2015;4:26.
353. Espedido BA, Steen JA, Ziochos H, Grimmond SM, Cooper MA, Gosbell IB, et al. Whole genome sequence analysis of the first Australian OXA-48-producing outbreak-associated *Klebsiella pneumoniae* isolates: the resistome and in vivo evolution. *PloS One.* 2013;8(3):e59920.
354. Hu Y, Liu C, Shen Z, Zhou H, Cao J, Chen S, et al. Prevalence, risk factors and



- molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008-2018. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):1771–9.
355. Yang Y, Yang Y, Chen G, Lin M, Chen Y, He R, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant and virulent plasmids in *Klebsiella pneumoniae* from patients with bloodstream infections in China. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):700–9.
356. Shao C, Hao Y, Wang Y, Jiang M, Jin Y. Genotypic and Phenotypic Characterization of bla NDM-7-Harboring IncX3 Plasmid in a ST11 *Klebsiella pneumoniae* Isolated From a Pediatric Patient in China. *Front Microbiol.* 2020;11:576823.
357. Characterisation of blaNDM-5 and blaKPC-2 co-occurrence in K64-ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34482020/>
358. Lu MC, Chen YT, Tang HL, Liu YY, Chen BH, Wang YW, et al. Transmission and evolution of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 in a single hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Feb 1;75(2):318–26.
359. Imtiaz W, Dasti JI, Andrews SC. Draft genome sequence of a carbapenemase-producing (NDM-1) and multidrug-resistant, hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolate from Pakistan, with a non-hypermucoviscous phenotype associated with rmpA2 mutation. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021 Jun;25:359–62.
360. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Mar 20;32(2):e00115-18.
361. Giakkoupi P, Tryfinopoulou K, Kontopidou F, Tsonou P, Golegou T, Souki H, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Dec;77(4):382–4.
362. Meletis G, Chatzopoulou F, Chatzidimitriou D, Tsingerlioti F, Botziori C, Tzimagiorgis G, et al. Whole Genome Sequencing of NDM-1-Producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* Isolated in a Private Laboratory in Greece. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2019 Feb;25(1):80–6.
363. Villa J, Viedma E, Brañas P, Mingorance J, Chaves F. Draft Whole-Genome Sequence of OXA-48-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* KP\_ST11\_OXA-48. *Genome Announc.* 2014 Jul 31;2(4):e00737-14.
364. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2015 Apr;53(4):1245–51.
365. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al.

- Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406–12.
366. Gijón D, Tedim AP, Valverde A, Rodríguez I, Morosini MI, Coque TM, et al. Early OXA-48-Producing Enterobacterales Isolates Recovered in a Spanish Hospital Reveal a Complex Introduction Dominated by Sequence Type 11 (ST11) and ST405 *Klebsiella pneumoniae* Clones. *mSphere.* 2020 Apr 8;5(2):e00080-20.
367. Baraniak A, Machulska M, Żabicka D, Literacka E, Izdebski R, Urbanowicz P, et al. Towards endemicity: large-scale expansion of the NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 lineage in Poland, 2015-16. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Nov 1;74(11):3199–204.
368. Protonotariou E, Meletis G, Chatzopoulou F, Malousi A, Chatzidimitriou D, Skoura L. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST11 co-producing NDM-1 and OXA-48 carbapenemases in Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019 Dec;19:81–2.
369. Solgi H, Shahcheraghi F, Bolourchi N, Ahmadi A. Molecular characterization of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 harbouring blaNDM-1 and blaOXA-48 carbapenemases in Iran. *Microb Pathog.* 2020 Dec;149:104507.
370. Arabaghian H, Salloum T, Alousi S, Panossian B, Araj GF, Tokajian S. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Lebanon. *Sci Rep.* 2019 Jan 24;9(1):531.
371. Xie L, Dou Y, Zhou K, Chen Y, Han L, Guo X, et al. Coexistence of blaOXA-48 and Truncated blaNDM-1 on Different Plasmids in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate in China. *Front Microbiol.* 2017;8:133.
372. Cizmeci Z, Aktas E, Otlu B, Acikgoz O, Ordekci S. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48-endemic area. *J Chemother Florence Italy.* 2017 Dec;29(6):344–50.
373. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y, multicentre study group. Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae isolates from 24 hospitals in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Aug;68(8):1832–7.
374. Bauraing C, Bogaerts P, Deplano A, Bouchahrouf W, Huang TD, Jans B, Denis O, Glupczynski Y. Molecular characterisation of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from Belgium. In *Abstracts of the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)*, Barcelona, Spain; 2014.
375. De Laveleye M, Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Sacré P, et al. Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2017

Jan;36(1):139–46.

376. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):75–80.
377. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):5696–703.
378. Fontana C, Angeletti S, Mirandola W, Cella E, Alessia L, Zehender G, et al. Whole genome sequencing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: evolutionary analysis for outbreak investigation. *Future Microbiol*. 2020 Feb;15:203–12.
379. Pulcrano G, Iula DV, de Luca C, Roscetto E, Vollaro A, Rossano F, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying blaKPC-3 in a hospital in southern Italy. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2014 Jan;122(1):42–6.
380. Piccirilli A, Perilli M, Piccirilli V, Segatore B, Amicosante G, Maccacaro L, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST512 causing bloodstream infections in ICU and surgery wards of a tertiary university hospital of Verona (northern Italy): co-production of KPC-3, OXA-48, and CTX-M-15  $\beta$ -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Mar;96(3):114968.
381. Fortini D, Villa L, Feudi C, Pires J, Bonura C, Mammina C, et al. Double Copies of bla(KPC-3)::Tn4401a on an IncX3 Plasmid in *Klebsiella pneumoniae* Successful Clone ST512 from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jan;60(1):646–9.
382. Conte V, Monaco M, Giani T, D'Ancona F, Moro ML, Arena F, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Dec;71(12):3386–91.
383. Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain JM. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbes New Infect*. 2015 Jan;3:34–6.
384. Lalaoui R, Bakour S, Livnat K, Assous MV, Diene SM, Rolain JM. Spread of Carbapenem and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST512 Clinical Isolates in Israel: A Cause for Vigilance. *Microb Drug Resist Larchmt N*. 2019 Feb;25(1):63–71.
385. Baraniak A, Izdebski R, Zabicka D, Bojarska K, Górska S, Literacka E, et al. Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010–14. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jun 1;72(6):1610–6.
386. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, et al. Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing

- Klebsiella pneumoniae (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Dec;44(6):538–40.
387. Asencio-Egea MÁ, Gaitán-Pitera J, Huertas-Vaquero M, Carranza-González R, Román-Ortiz C, Lara-Fuella N. Interhospital dissemination of KPC-3 producing-Klebsiella pneumoniae ST512. Detection by MALDI-TOF. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed*. 2021 Feb;39(2):83–6.
388. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Saez D, et al. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of Klebsiella pneumoniae ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Dec;71(12):3392–9.
389. Boonyasiri A, Jauneikaite E, Brinkac LM, Greco C, Lerdlamyong K, Tangkoskul T, et al. Genomic and clinical characterisation of multidrug-resistant carbapenemase-producing ST231 and ST16 Klebsiella pneumoniae isolates colonising patients at Siriraj hospital, Bangkok, Thailand from 2015 to 2017. *BMC Infect Dis*. 2021 Feb 4;21(1):142.
390. Alsharapy SA, Gharout-Sait A, Muggeo A, Guillard T, Cholley P, Brasme L, et al. Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Clinical Isolates in Al Thawra University Hospital, Sana'a, Yemen. *Microb Drug Resist Larchmt N*. 2020 Mar;26(3):211–7.
391. Shankar C, Mathur P, Venkatesan M, Pragasam AK, Anandan S, Khurana S, et al. Rapidly disseminating blaOXA-232 carrying Klebsiella pneumoniae belonging to ST231 in India: multiple and varied mobile genetic elements. *BMC Microbiol*. 2019 Jun 24;19(1):137.
392. Abdul Momin MHF, Liakopoulos A, Wareham DW. Draft Genome Sequence of a Multidrug-Resistant Sequence Type 231 Outbreak-Associated Clone of Klebsiella pneumoniae, KP41-2015, Producing OXA-232 Carbapenemase. *Genome Announc*. 2017 Jul 6;5(27):e00604-17.
393. Naha S, Sands K, Mukherjee S, Saha B, Dutta S, Basu S. OXA-181-Like Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae ST14, ST15, ST23, ST48, and ST231 from Septicemic Neonates: Coexistence with NDM-5, Resistome, Transmissibility, and Genome Diversity. *mSphere*. 2021 Jan 13;6(1):e01156-20.
394. Galani I, Karaiskos I, Angelidis E, Papoutsaki V, Galani L, Souli M, et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae of sequence type 39 during treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2021 Jan;40(1):219–24.
395. Weber RE, Pietsch M, Frühauf A, Pfeifer Y, Martin M, Luft D, et al. IS26-Mediated Transfer of bla NDM-1 as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital. *Front Microbiol*. 2019;10:2817.
396. Liu H, Wilksch J, Li B, Du J, Cao J, Zhang X, et al. Emergence of ST39 and ST656 extensively drug-resistant Klebsiella pneumoniae isolates in Wenzhou, China. *Indian J Med*

Microbiol. 2017 Mar;35(1):145–6.

397. Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec;50(5):1558–63.

398. Meletis G, Chatzopoulou F, Fragkouli A, Alexandridou M, Mavrovouniotis I, Chatzinikolaou A, et al. Whole-genome sequencing study of KPC-encoding *Klebsiella pneumoniae* isolated in Greek private laboratories from non-hospitalised patients. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Mar;20:78–81.

399. Belbel Z, Chettibi H, Dekhil M, Ladjama A, Nedjai S, Rolain JM. Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2014 Aug;20(4):310–5.

400. Okomo U, Senghore M, Darboe S, Bojang E, Zaman SMA, Hossain MJ, et al. Investigation of sequential outbreaks of *Burkholderia cepacia* and multidrug-resistant extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella* species in a West African tertiary hospital neonatal unit: a retrospective genomic analysis. *Lancet Microbe.* 2020 Jul;1(3):e119–29.

401. Karampatakis T, Zarras C, Pappa S, Vagdatli E, Iosifidis E, Roilides E, et al. Emergence of ST39 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 and KPC-2. *Microb Pathog.* 2022 Jan;162:105373.

402. Cubero M, Cuervo G, Dominguez MÁ, Tubau F, Martí S, Sevillano E, et al. Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST101 causing infection in a tertiary hospital. *BMC Microbiol.* 2015 Sep 3;15:177.

403. Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, et al. Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2763–6.

404. Dortet L, Flonta M, Boudehen YM, Creton E, Bernabeu S, Vogel A, et al. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in Romania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Nov;59(11):7100–3.

405. Mellouk FZ, Bakour S, Meradji S, Al-Bayssari C, Bentakouk MC, Zouyed F, et al. First Detection of VIM-4-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 2017 Apr;23(3):335–44.

406. Surleac M, Czobor Barbu I, Paraschiv S, Popa LI, Gheorghe I, Marutescu L, et al. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PloS One.* 2020;15(1):e0228079.

407. Fursova NK, Astashkin EI, Ershova ON, Aleksandrova IA, Savin IA, Novikova TS, et

- al. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Causing Severe Infections in the Neuro-ICU. *Antibiot Basel Switz.* 2021 Aug 13;10(8):979.
408. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A, et al. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Dec;40(6):510–5.
409. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jul;66(7):1510–3.
410. Papousek I, Papagiannitsis CC, Medvecky M, Hrabak J, Dolejska M. Complete Nucleotide Sequences of Two VIM-1-Encoding Plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Leclercia adecarboxylata* Isolates of Czech Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May;61(5):e02648-16.
411. Gong X, Zhang J, Su S, Fu Y, Bao M, Wang Y, et al. Molecular characterization and epidemiology of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from the Eastern region of Heilongjiang Province, China. *BMC Infect Dis.* 2018 Aug 22;18(1):417.
412. Hooban B, Fitzhenry K, O'Connor L, Miliotis G, Joyce A, Chueiri A, et al. A Longitudinal Survey of Antibiotic-Resistant Enterobacterales in the Irish Environment, 2019-2020. *Sci Total Environ.* 2022 Jul 1;828:154488.
413. Papagiannitsis CC, Giakkoupi P, Vatopoulos AC, Tryfinopoulou K, Miriagou V, Tzouvelekis LS. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* of a novel sequence type (ST383) producing VIM-4, KPC-2 and CMY-4  $\beta$ -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Dec;36(6):573–4.