

Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
"Κλινική Φαρμακολογία-Θεραπευτική"

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE**

ΜΠΑΚΑΛΗ ΣΤΑΜΑΤΙΑ
Ειδικευόμενη
Ιατρικής Βιοπαθολογίας

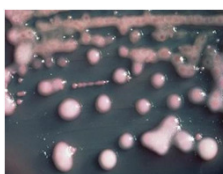
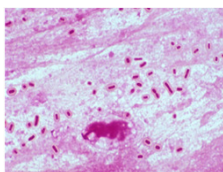
Αλεξανδρούπολη
Ιούνιος 2014

Ταξινόμηση

Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gammaproteobacteria
Order:	Enterobacteriales
Family:	Enterobacteriaceae
Genus:	Klebsiella
Species:	Klebsiella pneumoniae <i>subsp pneumoniae</i> <i>subsp ozenae</i> <i>subsp rhinoscleromatis</i> Klebsiella oxytoca Klebsiella granulomatis

Genus Klebsiella

- Gram αρνητικά
- προαιρετικά αναερόβια
- μη σπορογόνα
- ακίνητα βακτηρίδια
- πολυσακχαρικό έλυτρο



Λοιμογόνοι παράγοντες

- Πολυσακχαρικό αντιγόνο του ελύτρου (capsular polysaccharide-CPS)
- Λιποπολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος (σωματικό αντιγόνο O)
- Φίμπριες προσκόλλησης (Fimbriae)
- Σιδηροδεσμευτικά μόρια (Siderophores)

Παθογόνος δράση *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*

- Ουρολοιμώξεις
- Πνευμονία
- Βακτηραιμία
- Λοιμώξεις τραυμάτων

- Ένα από τα συχνότερα αίτια ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων
- Δεύτερο αίτιο Gram(-) βακτηριαμίας μετά την *Escherichia coli*

Επιδημιολογία

- Αποικίζει τον στοματοφάρυγγα ασθενών
- Ο αποικισμός και η μετέπειτα λοίμωξη σχετίζονται κυρίως με τη χρήση αντιβιοτικών
- Σημαντικό φορέα του μικροβίου αποτελεί το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό

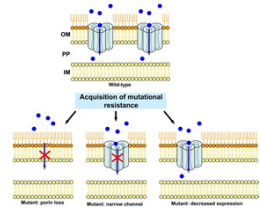
Επιδημιολογία

- Εμφανίζονται συχνά με τη μορφή επιδημιών σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας και Αυξημένης Φροντίδας
- Πολυανθεκτικά στελέχη (MDR)
- Αύξηση συχνότητας απομόνωσης τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στην Ελλάδα

Μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες

Μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης

- ελάττωση της έκφρασης
- αλλαγή του τύπου
- μετάλλαξη των πορινών (Omps)



Clin Microbiol Rev, 2012

Μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες

Αυξημένη εκροή (efflux pumps)

- λειτουργικά πολυπρωτεϊνικά συστήματα με πολύπλοκη δομή
- αντλίες που βίαια απομακρύνουν τα αντιβιοτικά, χρησιμοποιώντας δύναμη κινούμενη από πρωτόνια (proton-motive force, PMF)

MFS
Ox-A
Acriflavine
Benzalkonium
Cetrimide
Chlorhexidine
Pentamidine

MATE family
Nor-M
Aminoglycosides
Fluoroquinolones
Cationic drugs

SMR family
Ox-C
Acriflavine
Benzalkonium
Cetrimide

RND family
AcrA, AcrB, AcrC, AcrD
Numerous drugs

ABC super-family
Mac-A, Mac-B
Macrolides

MFS
Oxa-B, Oxa-C
Nalidixic acid
Nisobacterin

Inner membrane
Periplasm
nature REVIEWS MICROBIOLOGY

Μηχανισμοί αντοχής στις καρβαπενέμες

Απενεργοποίηση του αντιβιοτικού μέσω παραγωγής καρβαπενεμασών

- υδρόλυση των β-λακταμικών αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών
- ανθεκτικότητα στους αναστολείς των β-λακταμασών

Καρβαπενεμάσες

Ταξινόμηση κατά Ambler

Class A KPC SME IMI/NMC-A GES	Class B IMP VIM NDM
σερίνη στο ενεργό κέντρο	ψευδάργυρος στο ενεργό κέντρο
ευαισθησία των μονοβακτημιών	αντοχή των μονοβακτημιών
πλασμιδιακή εντόπιση συνήθως	στο χρωμόσωμα, πλασμίδια, ιντεγκρόνια κλάσσης 1
Class D OXA	
υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες	
OXA-48 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
OXA-23 και OXA-58 <i>Acinetobacter</i> spp	

Σκοπός της μελέτης

- η διερεύνηση της ανθεκτικότητας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες πολυανθεκτικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* με συμβατικές μεθόδους
- η εκτίμηση της αξιοπιστίας των φαινοτυπικών δοκιμασιών ανίχνευσης μηχανισμών αντοχής
- ο ακριβής καθορισμός των μηχανισμών αντοχής με μεθόδους Μοριακής Βιολογίας

Υλικό της μελέτης

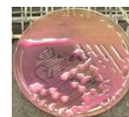
- 46 στελέχη *Klebsiella pneumoniae* - ανθεκτικά στις καρβαπενέμες
- χρονική περίοδος: Ιανουάριος 2011 - Μάρτιος 2013

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	%	Κλινικές	Αριθμός στελεχών	%
ΑΙΜΑ	29	63%	ΜΕΘ	28	55%
ΟΥΡΑ	9	19,5%	ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ	9	18%
ΚΑΘΗΤΗΡΕΣ	3	6,5%	ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ	5	14%
ΤΡΑΥΜΑΤΑ/ ΠΥΟΝ	2	4,3%	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ	4	8%
Β.Ε./ΠΥΕΛΑ ΕΝΥ	2	4,3%			
	1	2%			

Μέθοδοι

Καλλιέργεια κλινικού δείγματος

- Blood /Mac Conkey agar
- επώαση: αερόβια / 35°C / 18-24h



Καλλιέργεια αίματος-υγρών

- ειδικές φιάλες αερόβιας καλλιέργειας με ή χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών
- αυτοματοποιημένο σύστημα BacT-Alert (Bio Merieux-France)
- επώαση ≤5d
- ανακαλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά



Μέθοδοι

Βιοχημική ταυτοποίηση

Έλεγχος βιοχημικών ιδιοτήτων με αυτοματοποιημένο σύστημα (Vitek II, Biomerieux- France)



Μέθοδοι

Έλεγχος ευαισθησίας στους αντιμικροβιακούς παράγοντες

- Μέθοδος διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ (Kirby – Bauer)
- Προσδιορισμός MIC
- ✓ αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 (Bio-Merieux, France)
- ✓ δοκιμασία E-test

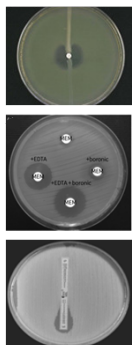


- QC : *Escherichia coli* ATCC 25922
- Ερμηνεία : CLSI document M100-S21 για τα Enterobacteriaceae

Μέθοδοι

Φαινοτυπικές δοκιμασίες ελέγχου παραγωγής καρβαπενεμάσης

- Modified Hodge test
- Combined-disk test
- E-test MBL



Μοριακές μέθοδοι

ανίχνευσης γονιδίων αντοχής

- Απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA extraction) PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τα γονίδια blaKPC, VIM, IMP, NDM και OXA-48 με χρήση ειδικών εκκινητών
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης περιεκτικότητας 2 %
- Η ανάλυση του μεγέθους των προϊόντων της PCR με κατάλληλο μοριακού δείκτη (1 kbp DNA Ladder, Fermentas)

Μοριακές μέθοδοι

KPC: 5'-ATGCTACTGTATCGCCGTCT-3'
5'-TTTTAGAGCCTTACTGCC-3'
προϊόν μεγέθους 893 bp

IMP: 5'-TGAGCAAGTTATCTGTATTC-3'
5'-TTAGTTGCTTGGTTTTGATG-3'
προϊόν μεγέθους 740 bp

OXA-48: 5'-GCTTGATCGCCCTCGATT-3'
5'-GATTTGCTCCGTGGCCGAAA-3'
προϊόν μεγέθους 281 bp

NDM: 5'-GGTTGGCGATCTGGTTTTTC-3'
5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3'
προϊόν μεγέθους 621 bp

VIM: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'
5'-ATGAAAGTGGTGGAGAC-3'
προϊόν μεγέθους 256bp

Αποτελέσματα

100% των στελεχών ανθεκτικά σε β-λακταμικά αντιβιοτικά, συνδυασμό β-λακταμικών με αναστολέα, κινολόνες, χλωραμφενικόλη

β-λακταμικά αντιβιοτικά
ουρεϊδοπενικιλίνες
καρβοξυπενικιλίνες
κεφαλοσπορίνες
(α', β', γ', δ' γενιάς)
κεφαμυκίνες
μονομπακτάμες

συνδυασμός
β-λακταμικών με αναστολέα
αμοξικιλίνη + κλαβουλανικό οξύ
αμοξικιλίνη + σουλπακτάμη
πιπερακιλίνη + ταζομπακτάμη
τικαρσιλλίνη + κλαβουλανικό οξύ

κινολόνες
σιπροφλοξασίνη
λεβοφλοξασίνη
μοξιφλοξασίνη
νορφλοξασίνη
οφλοξασίνη
χλωραμφενικόλη

Αποτελέσματα

Αντιμικροβιακή ουσία	% αντοχή (αριθμός στελεχών)
τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη	87%(40)
γενταμικίνη	70%(32)
τιγκεκυκλίνη	28%(13)
κολιστίνη	26%(12)
τετρακυκλίνη	22%(10)

Αποτελέσματα

Διακύμανση MIC - καρβαπενέμες

Ιμιπενέμη / μεροπενέμη 8 - $\geq 16\mu\text{g/ml}$

Δορυπενέμη 4 - $\geq 16\mu\text{g/ml}$

Ερταπενέμη $\geq 8\mu\text{g/ml}$

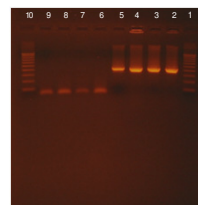
Αποτελέσματα

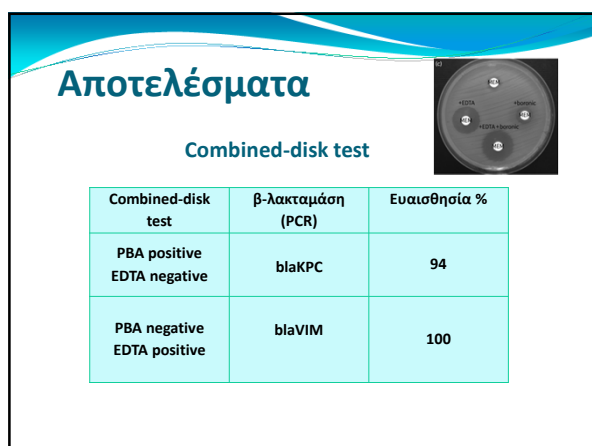
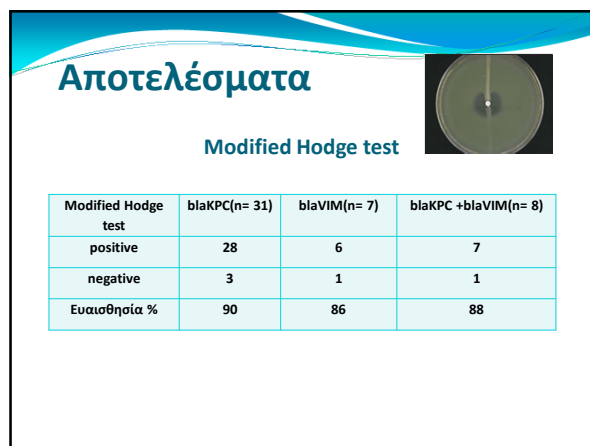
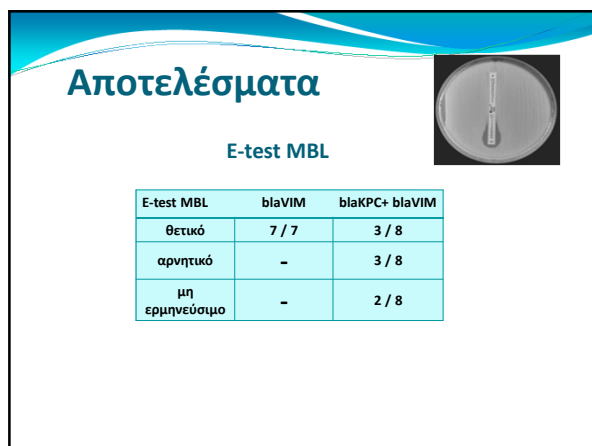
3 (6,5%) στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα
σε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών που ελέγχθησαν
(πανανθεκτικά στελέχη)

Αποτελέσματα

Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής

	blaKPC	blaVIM	blaKPC+blaVIM	blaIMP	blaNDM	blaOXA-48
αριθμός στελεχών	31	7	8	-	-	-
% ποσοστό	67,4%	15,2%	17,4%	-	-	-





Συζήτηση

- ✓ Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις που οφείλονται σε πολυανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae* αποτελούν σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως
- ✓ Η χώρα μας καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην Ευρώπη στην ανθεκτικότητα (7% των στελεχών ανθεκτικό σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες)

EARS- Net Surveillance Report, 2012

Συζήτηση

Η ύπαρξη των γονιδίων που εκφράζουν αντοχή σε μεταθετά γενετικά στοιχεία (πλασμίδια)

- ✓ οδηγεί στην ταχύτατη εξάπλωση της αντοχής
- ✓ αναδεικνύει το σημαντικότερο πρόβλημα της θεραπευτικής αντιμετώπισης των λοιμώξεων

Συζήτηση

Στην μελέτη μας τα στελέχη

- ✓ εμφάνισαν πολυαντοχή που αφορούσε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών
- ✓ υψηλή MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ για τις καρβαπενέμες ιμιπενέμη, μεροπενέμη, ερταπενέμη
- ✓ 3 (6,5%) στελέχη παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών που ελέγχθησαν (πανανθεκτικά στελέχη)
- ✓ τα χαμηλότερα ποσοστά αντοχής εμφανίζονται σε κολιστίνη, τιγκεκυκλίνη γενταμικίνη, τετρακυκλίνες

Συζήτηση

- ✓ Οι φαινοτυπικές μέθοδοι αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση των μηχανισμών αντοχής σε πολυανθεκτικά στελέχη *K.pneumoniae* με χαμηλό κόστος και απλότητα εφαρμογής
- ✓ Οι μοριακές μέθοδοι πλεονεκτούν λόγω ταχύτητας, υψηλής ακρίβειας, δυνατότητας ανίχνευσης άμεσα από το κλινικό δείγμα, ικανότητας ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών γονιδίων σε μία αντίδραση, ανίχνευσης μηχανισμών για τις οποίες δεν υπάρχει ειδική φαινοτυπική δοκιμασία (OXA-type)

Συζήτηση

- ✓ Ο κύριος μηχανισμός ανοχής αφορά το γονίδιο bla_{KPC} (67% των στελεχών) κυρίως σε ασθενείς της ΜΕΘ και της Αιματολογικής κλινικής
- ✓ Η παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών που ανιχνεύτηκε σε μικρότερο αριθμό στελεχών (15%) αφορούσε την ύπαρξη του γονιδίου bla_{VIM}

Συμπεράσματα

- ✓ Η εφαρμογή αξιόπιστων εργαστηριακών μεθόδων στην ρουτίνα των Μικροβιολογικών Εργαστηρίων συμβάλλει στην έγκαιρη ανίχνευση της ανοχής
- ✓ Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν τις μεθόδους εκλογής για τον ακριβή προσδιορισμό του μηχανισμού ανοχής
- ✓ Η γνώση των μηχανισμών αυτών θα επιτρέψει την επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος από τον κλινικό ιατρό

Συμπεράσματα

- ✓ Η μονοθεραπεία με παράγοντες όπως η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη και η φωσφομυκίνη συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά θεραπευτικής αποτυχίας
- ✓ Ως καλύτερη επιλογή φαίνεται να είναι τα συνδυασμένα θεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν την χορήγηση 2 ή και 3 αντιμικροβιακών παραγόντων

Συμπεράσματα

- ✓ Δεδομένου ότι οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες και επιπλέον δεν αναμένονται στο εγγύς μέλλον νέα φάρμακα ο καλύτερος τρόπος προστασίας των ασθενών είναι η ενίσχυση των μέτρων πρόληψης και ελέγχου των νοσοκομειακών λοιμώξεων από τα πολυανθεκτικά παθογόνα μικρόβια

Σας ευχαριστώ
για την προσοχή σας

