MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I DISTRIBUCIJA β-LAKTAMAZA PROŠIRENOG SPEKTRA U ESCHERICHIA COLI U UZNAPREDOVALOJ FAZI DISEMINACIJE MEĐU BOLNIČKIM I IZVANBOLNIČKIM PACIJENTIMA

Tomić Paradžik, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:714072

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Maja Tomić Paradžik

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I DISTRIBUCIJA β-LAKTAMAZA PROŠIRENOG SPEKTRA U *ESCHERICHIA COLI* U UZNAPREDOVALOJ FAZI DISEMINACIJE MEĐU BOLNIČKIM I IZVANBOLNIČKIM PACIJENTIMA

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Maja Tomić Paradžik

MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA I DISTRIBUCIJA β-LAKTAMAZA PROŠIRENOG SPEKTRA U *ESCHERICHIA COLI* U UZNAPREDOVALOJ FAZI DISEMINACIJE MEĐU BOLNIČKIM I IZVANBOLNIČKIM PACIJENTIMA

Doktorska disertacija

Osijek, 2019.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević, izvanredni profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku.

Komentorica rada: prof. dr. sc. Branka Bedenić, redovita profesorica u trajnome zvanju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad je izrađen u laboratoriju Službe za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije u Slavonskome Brodu, u Kliničkome zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, u Kliničkome bolničkome centru Zagreb i na Medicinskome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži 134 lista.

ZAHVALA

Zahvaljujem svome mentoru i voditelju doktorskoga studija izv. prof. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću na svesrdnoj pomoći, posvećenome vremenu, podržavanju tijekom izrade rada i iskazanoj ljudskoj dobroti. Hvala mojoj dragoj komentorici prof. dr. sc. Branki Bedenić koja mi je nesebično i bezuvjetno pomogla u ostvarenju ove disertacije. Zahvaljujem joj na satima rada provedenoga u laboratoriju, zajedničkim promišljanjima, strpljenju, prenesenome znanju i ljudskoj dobroti.

Zahvaljujem mr. sc. Stjepanu Katiću na tehničkoj pomoći u izradi PFGE analiza, strpljenju i vremenu koje smo proveli radeći na genotipizacijama izolata. Dubravku Šijaku, med. lab. techn., na računalnoj obradi podataka dobivenih PFGE analizom jer bez njegove pomoći ne bi smo dobili uspješne dendrogramske slike.

Hvala dr. sc. Gernotu Zarfelu na stručnoj pomoći u provođenju molekularnih metoda koje mi nisu bile dostupne u Hrvatskoj. Dr. sc. Aleksandri Presečki-Stanko hvala na nesebičnoj stručnoj pomoći u testiranju osjetljivosti studijskih izolata, Dijani Andrić, dipl. med. techn., na pomoći u prikupljanju osnovnih podataka o bolničkim pacijentima, a mojoj dugogodišnjoj kolegici i prijateljici Zdenki Trichler, dr. med., na prikupljenim izolatima s područja Vukovarsko-srijemske županije.

Branki Pecić, prof. hrvatskog jezika i književnosti i dr. sc. Igoru Marku Gligoriću mag. hrvatskog jezika i lingvistike zahvaljujem na lektoriranju ovoga rada. Svojoj kćeri, Barbari Pleić-Tomić, dipl. anglistici i komparatistici zahvaljujem na lektoriranju teksta na engleskome jeziku i podršci općenito.

Svojoj kćeri Steli i suprugu Borisu hvala na strpljenju, podršci i potpori tijekom izrade ovoga rada. Zahvaljujem i svojoj sestri dr. sc. Sanji Tomić na potpori, razmjeni znanja i ideja tijekom zajedničkih jutarnjih vožnji prema Rebru i na večernjim šetnjama po kvartu tijekom mojega boravka u Zagrebu. Hvala mojoj svekrvi Mariji Perc-Paradžik i pokojnome svekru Petru Paradžiku na podršci i obiteljskoj pomoći tijekom mojih boravaka izvan doma.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, majci Terezi Tomić rođ. Kereković i ocu doc. dr. sc. Arturu Tomiću, koji su me cijeli život poticali na učenje, znatiželju, preispitivanje činjenica, proširivanje znanja i na nesebičan prijenos znanja drugima.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Beta(β)-laktamaze 2
1.1.1. Gensko podrijetlo β-laktamaza 3
1.1.2. Povijesni razvoj β-laktamaza 3
1.2. Podjela β-laktamaza 4
1.2.1. Funkcionalna podjela β-laktamaza 4
1.2.2. Molekularna podjela β-laktamaza 11
1.3. β-laktamaze proširenoga spektra (ESBL) 13
1.3.1. Vrste β-laktamaza proširenoga spektra (ESBL) 16
1.3.2. Ostale ESBL 19
1.4. AmpC β-laktamaze 20
1.5. Karbapenemaze 21
1.6. Epidemiologija ESBL 22
1.6.1. Zemljopisna rasprostranjenost ESBL izolata 22
1.6.2. Molekularna epidemiologija ESBL producirajuće *E. coli* 24
1.7. Epidemijski plazmidi 26
1.8. Činitelji rizika za razvoj infekcije uzrokovane s ESBL producirajućim bakterijama 27
1.8.1. Terapija infekcija uzrokovanih sa ESBL producirajućim bakterijama 29
1.9. Laboratorijska detekcija i identifikacija ESBL producirajućih izolata 32
1.9.1. Fenotipski testovi za otkrivanje prisutnosti β-laktamaza 33
1.9.2. Molekularni testovi za otkrivanje prisutnosti ESBL enzima 34
2. HIPOTEZA RADA 37
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 38
4. MATERIJAL I METODE 39
4.1. Ustroj studije 39
4.2. Bakterijski izolati 39
4.3. Testiranje osjetljivosti na antibiotike 39
4.3.1. Disk-difuzijska metoda 40
4.3.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) 41
4.4. Fenotipska detekcija β-laktamaza 42
4.5. Testiranje prijenosa rezistencije konjugacijom 44
4.6. Genotipizacija izolata 45

4.6.1. Elektoforeza u pulsirajućem polju (PFGE)..... 45
4.6.2. MLST (engl. *Multilocus Sequence Typing*).....48
4.7. Molekularna karakterizacija β-laktamaza proširenoga spektra (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{OXA-48}$)..... 48
4.8. Određivanje inkompatibilne grupe plazmida multipleks-PCR metodom..... 50
4.9. Statistička obrada podataka.....50
5. REZULTATI.....51
5.1. Rezultati testiranja osjetljivosti na antibiotike..... 57
5.1.1. Rezultati disk-difuzijske metode testiranja osjetljivosti.....57
5.1.2. Rezultati osjetljivosti izolata metodom mikrodilucije u bujonu.....60
5.2. Rezultati fenotipskih testiranja.....64
5.3. Rezultati prijenosa otpornosti na antibiotike transkonjugacijom.....73
5.4. Rezultati molekularne karakterizacije β-laktamaza proširenoga spektra (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX–M}$, *bla*$_{OXA-48}$)..... 73
5.5. Rezultati određivanja inkompatibilnih grupa plazmida..... 74
5.6. Rezultati genotipizacije PFGE i MLTS metodom..... 76
5.7. Osnovni klinički rezultati pacijenata s invazivnim izolatima *E. coli* (izolati iz hemokultura)..... 90
6. RASPRAVA..... 91
7. ZAKLJUČAK.....106
8. SAŽETAK..... 108
9. SUMMARY.....110
10. LITERATURA..... 112
11. ŽIVOTOPIS.....126

POPIS SKRAĆENICA

AG	aminoglikozidi
AMP	ampicilin
AmpC	amplificirajuće (inducibilne) β-laktamaze
AMC	amoksicilin-klavulanska kiselina
AN	amikacin
BHI	engl. *brain heart infusion broth*
CA - UTI	engl. *Community Acquired Urinary Tract Infection* (izvanbolnička infekcija mokraćnoga sustava)
CZ	cefazolin
CTX	cefotaksim
CAZ	ceftazidim
CAZ – AVI	ceftazolon-tazobaktam
CRO	ceftriakson
CXM	cefuroksim
CIP	ciprofloksacin
COL	kolistin
CIM	engl. *Carbapenem Inactivation Method* (metoda inaktivacije karbapenema)
DD	disk-difuzija
DDST	engl. *Double Disc Synergy Test* (Test dvostrukoga diska)
E – test	gradijentni test
EARSS	engl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System-net*
ECDC	engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*
EPEC	engl. *Enteropathogenic E. coli* (enteropatogena *E. coli*)
ERT	ertapenem
ESBL	engl. *Extended Spectrum β-lactamases* (β-laktamaze proširenoga spektra)
ExPEC	engl. *Extraintestinal pathogenic E. coli* (izvanintestinalna *E. coli*)
FEP	cefepime
GEN	gentamicin
GES	engl. *Guiana extended spectrum β-lactamase*
GIM	engl. *German imipenemases*
HA-UTI	engl. *Hospital-Acquired Urinary Tract Infection* (bolnički stečena infekcija mokraćnoga sustava)

IMI	engl. *IMIpenem-hydrolysing β-lactamase*
IMP	imipenem
IMP	engl. *Imipenem metallo-β-lactamases*
JIL	jedinica intenzivnoga liječenja
KPC	engl. *K. pneumoniae Carbapenem resistant* (K. pneumoniae rezistentna na karbapenem)
MBL	engl. *Metallo-β-lactamases*
MDR	engl. *Multi Drug Resistant* (višestruko rezistentni)
McF	McFarland (standard gustoće suspenzije bakterijskoga soja)
MEM	meropenem
M-H	Muller-Hinton (agar)
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MISTYC	engl. *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*
MLST	engl. *Multilocus Sequence Typing*
NMC	engl. *Not metalloenzyme carbapenemase*
NDM	engl. *New Delhi metallo-β-lactamases*
OMP	engl. *Outer Membrane Protein* (proteini vanjske membrane)
OXA	engl. *Oxacillin hydrolyzing, carbapenem-hydrolysing oxacillinases*
PBRT	engl. *PCR-Based Replicon Typing* (tipizacija replikona reakcijom lančane polimeraze)
PCR	engl. *Polymerase Chain Reaction* (reakcija lančane polimeraze)
PCR – RFLP	engl. *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*
PCR - SSCP	engl. *Single-strand Conformational Polymorphism*
PFGE	engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (elektroforeza u pulsirajućem polju)
PTZ	piperacilin-tazobaktam
SAM	ampicilin-sulbaktam
SHV	engl. *sulfhydryl variable β-lactamases*
SIM	engl. *Seoul imipenemases*
SMART	engl. *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*
SME	engl. *Serratia marcescens* enzyme
SPM	engl. *Sao Paulo metallo-β-lactamases*
ST	slijedni tip (određuje pripadnost specifičnom klonu)
TEM	Temoniera (prezime pacijentice iz Grčke kod koje je uočena prva β-laktamaza

	proširenoga spektra)
TESSY	engl. *The European Surveillance System-Yearly*
VIM	engl. *Verona Integron-encoded metallo-ß-lactamases*

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Dopunjena funkcionalna podjela β-laktamaza po Bush – Jacoby 5

Tablica 1.2. Preporuke za terapiju infekcija uzrokovanih ESBL producirajućim izolatima 32

Tablica 4.1. Početnice upotrijebljene za dokaz *bla* gena..... 49

Tablica 5.1. Podrijetlo *E. coli* ESBL producirajućih izolata (N = 102), zemljopisno, ishodišno (bolnički/izvanbolnički) 52

Tablica 5.2. Vrsta biološkoga uzorka, bolnički i izvanbolnički izolati..... 53

Tablica 5.3. Potrošnja antibiotika u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević*, Slavonski Brod (2012. – 2016.) 57

Tablica 5.4. Antimikrobna osjetljivost izolata ESBL producirajuće *E. coli* disk-difuzijskom metodom kod bolničkih i izvanbolničkih pacijenata..... 59

Tablica 5.5. Antimikrobna osjetljivost izolata ESBL producirajuće *E. coli* metodom mikrodilucije u bujonu kod bolničkih i izvanbolničkih pacijenata..... 61

Tablica 5.6. Prijelomne točke testiranih antibiotika, raspon MIK-a, MIK50, MIK90 za sve testirane izolate..... 63

Tablica 5.7. Bolnički izolati, vrsta uzorka, MIK, rezultati fenotipskih testiranja (ESBL, AmpC, CIM)..... 68

Tablica 5.8. Izvanbolnički izolati, vrsta uzorka, MIK, rezultati fenotipskih testiranja (ESBL, AmpC, CIM)..... 71

Tablica 5.9. Rezultati transkonugacije, ishodišta β-laktamaza, PFGE, ST, PBRT, IS – bolnički izolati 81

Tablica 5.10. Rezultati transkonugacije, ishodišta β-laktamaza, PFGE, ST, PBRT, IS – izvanbolnički izolati 86

Tablica 5.11. Raspodjela klonalnih grupa, podgrupa i *bla* gena..... 89

Tablica 5.12. Kliničke osobitosti i ishod pacijenata sa *E. coli* ESBL bakterijemijom..... 90

POPIS SLIKA

Slika 5.1. Kretanje bolničkih i izvanbolničkih izolata *E. coli* ESBL (N) i E. coli (N) od 2011. do 2016. godine na području Brodsko-posavske županije..... 51

Slika 5.2. Distribucija pacijenata prema dobi i spolu (N) 53

Slika 5.3. Distribucija bolničkih izolata (N) prema odjelima i vrsti uzorka..... 54

Slika 5.4. Prikaz povećanja broja izolata *E. coli* ESBL na sve *E. coli* iz primarno sterilnih uzoraka (hemokulture) od 2011. do 2016. godine 55

Slika 5.5. Usporedba porasta učestalosti izolata *E. coli* ESBL (%) na ukupne *E. coli* iz ostalih vrsta uzoraka hospitaliziranih pacijenata od 2011. do 2016. godine 56

Slika 5.6. Metoda dvostrukoga diska (DDST) na M-H agaru..... 64

Slika 5.7. Metoda dvostrukoga diska (DDST) na M-H agaru..... 65

Slika 5.8. E-test ESBL na M-H agaru 65

Slika 5.9. Modificirani *Hodge Test* na McConkey agaru..... 66

Slika 5.10. Modificirani CIM test na M-H agaru 67

Slika 5.11. Elektroforeza PCR produkata za određivanje tipa β-laktamaza 74

Slika 5.12. Elektroforeza PBRT-PCR produkata..... 75

Slika 5.13. Dendrogramski prikaz svih studijskih izolata *E. coli* ESBL..... 78

Slika 5.14. Dendrogramski prikaz bolničkih izolata *E. coli* ESBL..... 84

Slika 5.15. Dendrogramski prikaz izvanbolničkih izolata *E. coli* ESBL..... 88

Slika 5.16. PFGE 27 studijskih izolata *E. coli* ESBL..... 89

1. UVOD

Escherichia coli dio je normalne flore probavnoga sustava čovjeka i jedan od najčešćih uzročnika infekcija, poput bakterijemije i sepse kod bolničkih pacijenata te mokraćnoga sustava bolničkih i izvanbolničkih pacijenata. Tijekom infekcije do izražaja dolaze različiti činitelji virulencije *E. coli* i iskazuju se različite fenotipske osobitosti koje su najčešće kodirane kromosomski ili plazmidno (1, 2). Enteropatogene *E. coli* (engl. *enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC) i dalje predstavljaju problem u dječjoj populaciji nerazvijenih zemalja i zemalja u razvoju, dok su u razvijenim zemljama s uspostavljenom vodovodno-kanalizacijskom mrežom postale uglavnom pojedinačni i rijetki uzročnik proljeva kod djece. U razvijenim zemljama zabrinjavajući je porast rezistencije ekstraintestinalne *E. coli* (engl. *extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) s najčešćim ishodištem u mokraćno-spolnome sustavu, na beta(β)-laktamske antibiotike uslijed produkcije enzima β-laktamaze proširenoga spektra, ESBL (engl. *extended-spectrum ß-lactamases*). Divlji izolati *E. coli* dobro su osjetljivi na antibiotike, ali uspješno stječu otpornost prema njima te je među ESBL negativnim *E. coli* 60 % izolata otporno na ampicilin, a 38 % na kotrimoksazol (3). β-laktamski antibiotici koriste se svakodnevno u liječenju bakterijskih infekcija, a β-laktamaze enzimi su koji hidroliziraju β-laktamski prsten antibiotika i čine beta-laktamski antibiotik nedjelotvornim. Bakterije koje luče β-laktamaze najprije su uočene u bolničkim sredinama, najčešće kod vrsta *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, no danas ih u velikome broju dokazujemo i u izvanbolničkih pacijenata (4). *E. coli* glavni je uzročnik infekcija mokraćnoga sustava izvanbolničkih i bolničkih pacijenata koje se ubrajaju u najčešće bakterijske infekcije odrasle dobi pa povećanje rezistencije na antibiotike ima značajan utjecaj na morbiditet i mortalitet. Neracionalna primjena antibiotika, dugotrajne antimikrobne terapije niskim dozama terapeutika dovode do mutacija i probira otpornih pripadnika crijevne flore (crijevne mikrobiote), čiji je *E. coli* stalni član. Uslijed selekcijskoga pritiska i kolonizacije velikoga anatomskoga područja, poput probavnoga trakta, otpornim mutantama, kontrola je širenja izuzetno teška (2, 4). Do kraja 2014. godine β-laktamaza producirajući izolati *E. coli* sporadično su prisutni na području Hrvatske, i to do 10 % godišnje od ukupnoga broja izoliranih *E. coli.* Tijekom 2015. godine uočeno je povećanje broja takvih izolata iz kliničkih uzoraka bolničkih i izvanbolničkih pacijenata. Uslijed povećanja incidencije takvih izolata na području Brodsko-posavske županije otpornost *E. coli* na cefalosporine III. generacije porasla je s 8 % u 2014. na 24 % u 2016. godini (3).

1.1. Beta(β)-laktamaze

β-laktamaze bakterijski su enzimi koji hidrolizom razgrađuju β-laktamski prsten penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema. Lučenje β-laktamaza glavni je mehanizam rezistencije kliničkih izolata na β-laktamske antibiotike, a proizvode ih gram-negativni kao i gram-pozitivni mikrorganizmi. β-laktamaze gram-negativnih bakterija nalaze se u periplazmatskome prostoru bakterijske stanice te onemogućuju aktivnost antibiotika prije stizanja do ciljnoga mjesta. β-laktamaze gram-pozitivnih bakterija izlučuju se izvanstanično, no ponekad mogu biti adherirane za citoplazmatsku membranu (4). Uvođenjem novih antibiotika ili novih kombinacija već postojećih antibiotika u kliničku praksu uočavamo brojne promjene upravo u tipovima β-laktamaza koje luče gram-negativne bakterije. Gram-negativne bakterije, kao i *E. coli*, najčešći klinički izolat te skupine mikroorganizama, stvorile su nove načine obrane od djelovanja β-laktamskih antibiotika bilo lučenjem enzima koji djeluju na novi supstrat bilo lučenjem multiplih β-laktamaza (4, 5, 6). Do danas je iz kliničkih uzoraka otkriveno blizu petsto β-laktamaza koje se razlikuju po jedinstvenome slijedu aminokiselina i fenotipskim obilježjima (7).

β-laktamaze razaraju β-laktamski prsten na dva glavna načina. Ciljno su mjesto vezivanja proteinski receptori stanice odgovorni za vezanje penicilinskih antibiotika (engl. *penicillin binding protein*, PBP) s kojim čine homolognu sekvenciju i dovode do njegova inaktiviranja. U većini slučajeva proces počinje nekovalentnim vezanjem aktivnoga serinskoga mjesta enzima s antibiotikom stvarajući nekovalentni Michaelisov kompleks. Nakon toga hidroksilna se skupina aktivnoga serinskoga mjesta enzima veže za β-laktamski prsten antibiotika stvarajući kovalentni kiseli ester. Hidrolizom estera dolazi do oslobađanja aktivnoga enzima i inaktiviranoga (hidroliziranoga) antibiotika (4). Enzimi sa serinskim aktivnim mjestom inaktiviraju peniciline, cefalosporine i monobaktame. β-laktamaze koje inaktiviraju ß-laktamski prsten pomoću iona cinka (Zn^{2+}) vezanoga za histidinski ostatak, cisteinski ostatak ili za oba čine manji broj β-laktamaza i nazivaju se metalo-β-laktamaze (engl. *metallo-β-lactamases*, MBLs), a reagiraju s karboksilnom skupinom penicilina, cefalosporina i karbapenema (4). Djelotvornost β-laktamaza ovisi o njihovu afinitetu za određeni supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini izlučenoga enzima i propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija (5).

1.1.1. Gensko podrijetlo β-laktamaza

Uzevši u obzir gensko podrijetlo, β-laktamaze mogu biti kromosomske ili plazmidne (4). Kromosomske β-laktamaze kodirane su kromosomalnim genima bakterijske stanice, a mogu biti *konstitutivne* i *inducibilne*. *Konstitutivne* kromosomske β-laktamaze u neprekidnome su stvaranju neovisno o prisutnosti β-laktamskoga antibiotika. Kromosomske konstitutivne β-laktamaze grupe A luče npr. izolati roda *Klebsiella* (4, 5). *Inducibilne* kromosomske β-laktamaze stvaraju se prilikom izlaganja bakterije djelovanju β-laktamskoga antibiotika. Takvi mikroorganizmi imaju sposobnost bazalnog lučenja enzima u vrlo malim količinama, no nakon izlaganja β-laktamskome spoju višestruko povećavaju količinu izlučenoga enzima (7, 8). Plazmidne β-laktamaze kodirane su malim, prenosivim i vrlo pokretnim genskim elementima, poput plazmida i transpozona. Nisu vrsno specifične poput kromosomskih, već se mogu širiti između različitih vrsta gram-negativnih bakterija konjugacijom, a kod gram-pozitivnih transdukcijom preko bakteriofaga. Nazivaju se još i sekundarne β-laktamaze jer se u bakterijskoj stanici nalaze kao dodatni enzimi uz kromosomski kodirane β-laktamaze. Iako su zasebne i različite od kromosomskih postoje preklapanja s obzirom na podrijetlo. Plazmidne β-laktamaze prisutne su kod vrsta *Staphylococcus, Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae* i brojnih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae,* a smatra se da su potekle od kromosomskih β-laktamaza (4, 5, 6).

1.1.2. Povijesni razvoj β-laktamaza

Otpornost bakterija na antibiotike postojala je i prije njihova otkrića i primjene u kliničkoj praksi. Klinička upotreba penicilina, koja počinje 1944. godine, djelovala je selekcijski i dovela do povećanja otpornosti *Staphylococcus aureus* na penicilin uslijed širenja plazmida koji kodira lučenje penicilinaze. Uspješnim širenjem toga plazmida među rodom *Staphylococcus* i druge vrste stafilokoka postaju otporne na penicilin. Sredinom 80-ih godina 20. stoljeća više od 90 % stafilokoka postalo je otporno na penicilin (9). Otkriće β-laktama otpornih na djelovanje penicilinaza (meticilin, oksacilin, kloksacilin, flukloksacilin) kratkotrajno je riješilo problem terapije stafilokoknih infekcija, ali su se ubrzo pojavili meticilin-rezistentni stafilokoki (MRSA, od engl. *Methicillin Resistant Staphylococus aureus*) otporni na sve dostupne β-laktamske antibiotike uslijed promjene strukture PBP molekula. Brzome širenju otpornosti doprinijela je pokretljivost plazmida i transpozoma (4, 5).

Prva plazmidski kodirana β-laktamaza proširenoga spektra (ESBL) dokazana je u Grčkoj 1965. godine u kliničkome izolatu *E. coli* i nazvana je TEM-1 prema imenu pacijentice (grč.

Temoniera) iz čije je hemokulture izolirana. Nakon TEM-1 1969. godine otkrivena je β-laktamaza TEM-2 u izolatu *Psudomonas aeruginosa,* a od TEM-1 razlikuje se u slijedu aminokiselina pa je na poziciji 37 glutamin zamijenjen serinom. Treći progenitorski enzim, SHV-1 (engl. *sulfhydryl variable β-lactamases*), kromosomski je kodiran enzim vrste *Klebsiella pneumoniae* čiji je promotorski gen prenesen na plazmid, zatim je konjugacijom prenesen na *E. coli*, a opisan je 1974. godine (6). Nekoliko godina nakon prve izolacije TEM-1, β-laktamaze proširile su se po cijelome svijetu te se nove varijante i dalje otkrivaju kod različitih bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* te vrsta *Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae* (10).

1.2. Podjela β-laktamaza

β-laktamaze možemo podijeliti na temelju funkcionalnih i molekularnih osobitosti. Postoji više funkcionalnih podjela koje su nastale na temelju određivanja funkcionalnih osobitosti β-laktamaza, kao što su njihov hidrolitički spektar, osjetljivost na inhibitore, izoelektrična točka ili molekularna težina. Molekularna podjela temelji se na određivanju slijeda aminokiselina (11, 12). Danas su u primjeni funkcionalna podjela prema K. Bush i sur. te molekularna podjela prema Ambler (11, 12, 13).

1.2.1. Funkcionalna podjela β-laktamaza

Funkcionalne podjele temelje se na funkcionalnim osobinama enzima, poput hidrolitičke aktivnosti prema vrsti supstrata i prema djelotvornosti inhibitora. Tijekom godina pojavile su se brojne funkcionalne podjele koje nisu u konačnici omogućile razlikovanje originalnih enzima i njihovih sve brojnijih inačica. Podjelom prema Bush iz 1989. godine uklonile su se dotadašnje dvojbe i nedostaci. Podjela prema Bush nadopunjena je 1995. i 2010. godine (12, 13).

Tablica 1.1. Dopunjena funkcionalna podjela β-laktamaza prema Bush i Jacobyju (13)

Bush-Jacobyjeve grupe (2009)	Bush-Jacoby-Medeiroseve grupe (1995)	Molekularne grupe i podgrupe	Supstrati	Inhibirani s		Osobine	Tipični predstavnici
				KK* ili TZB†	EDTA‡		
1	1	C	Cefalosporini	Ne	Ne	Bolja hidroliza cefalosporina nego benzilpenicilina; hidroliza cefamicina	*E. coli* AmpC§, P99‖, ACT-1¶, CMY-2**, FOX-1††, MIR-1‡‡
1e	NI¶¶¶¶¶	C	Cephalosporini	Ne	Ne	Povećana hidroliza ceftazidima i često drugih oksimino-β-laktama	GC1§§ CMY-37‖‖
2a	2a	A	Penicilini	Da	Ne	Bolja hidroliza benzilpenicilina nego cefalosporina	PC1¶¶
2b	2b	A	Penicilini, stariji cephalosporini	Da	Ne	Podjednaka hidroliza benzilpenicilina i cefalosporina	TEM-1*** TEM-2*** SHV-1†††
2be	2be	A	Cefalosporini proširenog spektra, monobaktami	Da	Ne	Povećana hidroliza oksimino-β-laktama (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, cefepime, aztreonam)	TEM-3*** SHV-2††† CTX-M-15‡‡‡ PER-1§§§ VEB-1‖‖
2br	2br	A	Penicilini	Ne	Ne	Rezistencija na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam	TEM-30*** SHV-10†††
2ber	NI¶¶¶¶¶	A	Cefalosporini proširenog spektra, monobaktami	Ne	Ne	Povećana hidroliza oksimino-β-laktama kombinirana s rezistencijom na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam	TEM-50***
2c	2c	A	Karbenicilin	Da	Ne	Povećana hidroliza karbenicilina	PSE-1¶¶¶ CARB-3****
2ce	NI¶¶¶¶¶	A	Karbenicilin, cefepim	Da	Ne	Povećana hidroliza karbenicilina, cefepima i cefpiroma	RTG-4††††

Bush-Jacobyjeve grupe (2009)	Bush-Jacoby-Medeiroseve grupe (1995)	Molekularne grupe i podgrupe	Supstrati	Inhibirani s		Osobine	Tipični predstavnici
				KK* ili TZB†	EDTA‡		
2d	2d	D	Kloksacilin	Varijabilno	Ne	Povećana hidroliza kloksacilina ili oksacilina	OXA-1‡‡‡‡ OXA-10‡‡‡‡
2de	NI¶¶¶¶¶¶	D	Cefalosporini proširenog spektra	Varijabilno	Ne	Hidroliza kloksacilina, oksacilina i oksimino-β-laktama	OXA-11‡‡‡‡ OXA-15‡‡‡‡
2df	NI¶¶¶¶¶¶	D	Karbapenemi	Varijabilno	Ne	Hidroliza klokscilina ili oksacilina i karbapenema	OXA-23‡‡‡‡ OXA-48‡‡‡‡
2e	2e	A	Cefalosporini proširenog spektra	Da	Ne	Hidroliza cefalosporina; inhibirani s klavulanskom kiselinom, ali ne i aztreonamom	CepA§§§§
2f	2f	A	Karbapenemi	Varijabilno	Ne	Povećana hidroliza karbapenema, oksimino-β-laktama, cefamicina	KPC-2‖‖‖‖ IMI-1¶¶¶¶ SME-1*****
3a	3	B (B1)	Karbapenemi	Ne	Da	Hidroliza širokoga spektra uključujući karbapeneme, ali ne i monobaktame	IMP-1†††††† VIM-1‡‡‡‡‡ CcrA§§§§§ IND-1‖‖‖‖
		B (B3)					L1¶¶¶¶¶ CAU-1****** GOB-1†††††† FEZ-1‡‡‡‡‡‡
3b	3	B (B2)	Karbapenemi	Ne	Da	Hidroliza karbapenema	CphA§§§§§§ Sfh-1‖‖‖‖‖
NI¶¶¶¶¶¶	4	Nepoznato					

*klavulanska kiselina; †tazobaktam; ‡EDTA; §inducibilne (*amplificirajuće*) β-laktamaze; ‖kromosomski kodirana cefalosporinaza iz *Enterobacter cloacae* P99; ¶plazmidno kodirana, inducibilna β-laktamaza *E. cloacae*; **cephamycinase* (plazmidno kodirana inducibilna β-laktamaza otporna na cefamicine i karbapeneme otkrivena u *E. aerogenes*); ††*cefoxitinase* (plazmidno kodirana inducibilna β-laktamaza otporna na cefoksitin); ‡‡*Miriam Hospital in Providence* (plazmidno kodirana inducibilna β-laktamaza otkrivena u navedenoj ustanovi); §§inducibilna β-laktamaza širokoga spektra otkrivena u *E. cloacae*; ‖inačica kromosomski kodirane inducibilne β-laktamaze *Citrobacter freundii*; ¶¶ β-laktamaza (penicilinaza) *S. aureus*;

***prva otkrivena plazmidno kodirana β-laktamaza *E. coli* i njene inačice (*Temoniera*, ime pacijentice iz Atene kod koje je prvi puta izoliran navedeni enzim, 1963. godine); †††plazmidno kodirana β-laktamaza *K. pneumoniae* i njene inačice; ‡‡‡plazmidno kodirana β-laktamaza (*cefotaximase*) potekla iz kromosomski kodiranoga enzima *Kluyvera* spp.; §§§plazmidno kodirana β-laktamaza *P. aeruginosa*; ||||plazmidno kodirana β-laktamaza *P. aeruginosa*; ¶¶¶plazmidno kodirana β-laktamaza *P. aeruginosa* (*Pseudomonas-specific enzymes*) naknadno dokazana i u vrstama iz porodice enterobakterija; ****plazmidno kodirana β-laktamaza (*carbenicillinase*) *P. aeruginosa*; ††††plazmidno kodirana β-laktamaza *A. baumannii* koja se u literaturi navodi i pod imenom *CARB-10*;

‡‡‡‡ kromosomski i(li) plazmidno kodirana grupa β-laktamaza (*oxacillin-hydrolyzing*), prvi puta otkrivene u izolatima *A. baumannii*, potom kod vrsta iz porodice enterobakterija i u izolatima *P. aeruginosa* (OXA-10), inačice se razlikuju prema sklonosti određenom supstratu (*oxacillinase, cephalosporinase, carbapenemase*); §§§§cefalosporinaza izolirana iz *Bacteroides fragilis*; ||||*K. pneumoniae carbapenemase*; ¶¶¶¶karbapenem hidrolizirajuća β-laktamaza izolirana iz *E. cloacae*; *****karbapenem hidrolizirajuća β-laktamaza izolirana iz *Serratia marscenses*; †††††plazmidno kodirana metalo-β-laktamaza (karbapenemaza) otkrivena u izolatima *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp.; ‡‡‡‡‡*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*; §§§§§kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza (karbapenemaza) prisutna u *Bacteroides fragilis*; |||||plazmidno kodirana metalo-β-laktamaza širokog hidrolitičkog spektra otkrivena u *Chryseobacterium* (*Flavobacterium) indologenes*; ¶¶¶¶¶kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza otkrivena u *Stenotrophomonas maltophilia*; *******kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza otkrivena u *Caulobacter crescentus*; ††††††kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza otkrivena u *Elizabethkingia meningoseptica*; ‡‡‡‡‡‡kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza otkrivena u *Legionella (Fluoribacter)gormanii*; §§§§§§ kromosomski kodirana metalo-β-laktamaza otkrivena u vrstama roda *Aeromonas*; ||||||kromoskomski kodirana metalo-beta-laktamaza otkrivena u *Serratia fonticola*; ¶¶¶¶¶¶ nije uključeno

Grupa 1 obuhvaća kromosomski kodirane cefalosporinaze brojnih enterobakterija koje bolje hidroliziraju cefalosporine od penicilina, nisu inhibirane klavulanskom kiselinom i dobro razgrađuju cefamicine, poput cefoksitina. Pojedini mikroorganizmi mogu ih izlučivati u velikoj količini, što dovodi do rezistencije na karbapeneme, pogotovo na ertapenem. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi C.

Unutar grupe 1 nalazi se nova podgrupa 1e enzima s boljom hidrolizom ceftazidima i drugih oksimino-β-laktama. Bolja je hidroliza posljedica insercije ili delecije fragmenata na amino kraju enzima. Ta podgrupa naziva se još i AmpC β-laktamaze proširenoga spektra i uključuje enzime GC1 *Entreobacter cloacae* i plazmidski posredovane CMY-10, CMY-19 i dr. Klinički su značajne kod izolata koji uz navedene enzime posjeduju i promjene na porinima, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi C.

Funkcionalna grupa 2, serinske β-laktamaze, predstavlja najveću skupinu β-laktamaza zbog velikoga broja enzima sličnih osobitosti, a obuhvaća penicilinaze, cefalosporinaze, enzime inhibirane klavulanskom kiselinom te enzime koje klavulanska kiselina ne inhibira ili je ta aktivnost varijabilna. Prema zadnjoj ažuriranoj podjeli prema Bush i sur. iz 2010. godine unutar grupe 2 postoji 12 podgrupa, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupama A i D. Podgrupa 2a malena je skupina enzima s ograničenim spektrom hidrolitičke aktivnosti usmjerene uglavnom na peniciline, a prisutni su kod stafilokoka i enterokoka. Većina tih enzima kromosomskoga je podrijetla, osim maloga broja stafilokoknih penicilinaza koje mogu biti kodirane plazmidima. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupa 2b obuhvaća β-laktamaze proširenoga spektra koje podjednako hidroliziraju peniciline i cefalosporine te su dobro inhibirane klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. Obuhvaćaju plazmidski kodirane enzime TEM-1, TEM-2 i SHV-1 koji su otkriveni kasnih 70-ih i ranih 80-ih godina prošloga stoljeća. Od 1995. godine otkriveno je još 9 TEM i 29 SHV enzima uvrštenih u 2b podgrupu. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupa 2be sadrži β-laktamaze proširenoga spektra (ESBLs) koje hidroliziraju sve supstrate kao i enzimi podgrupe 2b, oksimino-β-laktame (poput cefalosporina treće generacije; ceftriakson, ceftazidim, cefotaksim), monobaktama (poput aztreonama), ali i cefalosporine četvrte generacije (poput cefepima). Najbrojnija podskupina podgrupe 2b nastala je zamjenom aminokiselina u TEM-1, TEM-2 i SHV-1, što im je proširilo spektar hidrolitičke aktivnosti uz posljedično smanjenje aktivnosti prema benzilpenicilinu i cefaloridinu. TEM i SHV skupinama β-laktamaza proširenoga spektra (ESBLs) pridružila se funkcionalno slična, brzo

rastuća skupina CTX-M (engl. *cefotaximases*, CTX-M-ases), enzima koji su povezani s kromosomski kodiranim β-laktamazama vrste *Kluyvera*. Većina CTX-M enzima, iako ne svi, bolje hidroliziraju cefotaksim i cefepim od ceftazidima, dobro su inhibirani tazobaktamom, a značajno slabije klavulanskom kiselinom. Osim prethodno navedenih u podgrupu 2b svrstane su β-laktamaze proširenoga spektra nepovezane s TEM, SHV ili CTX-M, a to su BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 te članovi PER i WEB porodica enzima. Karakteristika koja pomaže u uočavanju najčešće prisutnih enzima iz podgrupe 2b tijekom rutinskoga laboratorijskoga rada osjetljivost je na klavulansku kiselinu koja ih dobro inhibira. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupa 2br (inhibitor-otporni derivati TEM-enzima) obuhvaća β-laktamaze proširenoga spektra koje posjeduju stečenu otpornost na klavulansku kiselinu i sulbaktam, a uglavnom su osjetljive na tazobaktam. Otpornost na tazobaktam iskazuju oni enzimi ove skupine koji posjeduju promijenjeni amino kraj na poziciji met69. Značajniji su predstavnici te podgrupe TEM-30, TEM-31 i SHV-10. CTX-M β-laktamaze do trenutka ažuriranja ove podjele nisu iskazivale navedene osobitosti. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A. Zanimljivo svojstvo inhibitor rezistentnih TEM β-laktamaza je da se one isključuju s ESBL fenotipom, što znači da soj može imati ili IRT ili ESBL ali nikako oba tipa β-laktamaza.

Podgrupa 2ber uključuje TEM enzime s najčešće dokazanim predstavnikom TEM-50 koji iskazuju sposobnost povećane hidrolize cefalosporina proširenoga spektra i monobaktama u kombinaciji s otpornošću na klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupu 2c čine penicilinaze hidrolitički aktivne prema benzilpenicilinu, karbenicilinu, tikarcilinu, kloksacilinu i oksacilinu. Inhibirane su klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom. Predstavnici ove podgrupe su PSE-1 i CARB-3, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupu 2ce čine karbenicilinaze proširenoga spektra, poput RTG-4 ili CARB-10, s hidrolitičkom aktivnošću prema pojedinim cefalosporinima, poput cefepima i cefpiroma. Inhibiraju ih klavulanska kiselina i tazobaktam, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

Podgrupa 2d obuhvaća β-laktamaze koje se odlikuju bržom sposobnošću hidrolize kloksacilina i oksacilina nego benzilpenicilina i poznati su pod nazivom OXA (engl. *oxacilin-*

hydrolysing) enzimi. Vrlo dobro hidroliziraju i karbenicilin. Većina pripadnika porodice OXA enzima definirana je prema očuvanome redoslijedu aminokiselina, a ne prema funkcionalnim osobitostima. Velik broj enzima iz te porodice može se inhibirati natrijevim kloridom dok je inhibicija klavulanskom kiselinom varijabilna. Porodica OXA enzima danas predstavlja drugu prema veličini porodicu β-laktamaza. Pojedini pripadnici te porodice su ESBL enzimi, češći klinički predstavnici su OXA-1 i OXA-10, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi D.

Novouspostavljena 2de podgrupa obuhvaća enzime proširenoga spektra djelovanja koji hidroliziraju klokascilin ili oksacilin, oksimino-β-laktame, ali ne i karbapeneme. Većina enzima te podgrupe izvedenica je OXA-10 enzima. Kod pojedinih izvedenica mogu postojati promjene samo na jednoj aminokiselini dok kod drugih mogu biti prisutne na većem broju aminokiselina (do devet). Predstavnici ove podskupine su OXA-11 i OXA-15 i najčešće su registrirani u Turskoj i Francuskoj u izolatima *Pseudomonas aeruginosa.* Osobitost ovih enzima je bolja hidroliza ceftazidima u odnosu na hidrolizu cefotaksima ili aztreonama, no izolati koji luče OXA-1 ili OXA-31 pokazuju bolju hidrolizu cefepima nego ceftazidima. Prema molekularnoj podjeli također pripadaju grupi D.

2df također je potpuno nova podgrupa OXA enzima koji osim hidrolize kloksacilina i oksacilina posjeduju sposobnost hidrolize karbapenema. Najčešće ih nalazimo kod izolata *Acinetobacter baumannii* i kodirani su kromosomski smještenim genima. Kod vrsta iz porodice enterobakterija geni za OXA-23 i OXA-48 smješteni su na plazmidima. Izolati koji proizvode te enzime obično su otporni na karbapeneme izuzev transkonjuganata *E. coli* koji su osjetljivi na karbapeneme, ali ih ne inhibira klavulanska kiselina. Prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi D.

Podgrupu 2e čine cefalosporinaze proširenoga spektra koje inhibira klavulanska kiselina, ali ne i aztreonam. Predstavnici ove grupe su inducibilne, kromosomalne cefalosporinaze vrste *Proteus* koje se mogu zamijeniti za grupu 1 AmpC enzima ili za ESBL enzime jer se nalaze u srodnim izolatima sa sličnim osobitostima otpornosti. Od AmpC enzima mogu se razlikovati na temelju slabe inhibicije aztreonamom i dobre inhibicije klavulanskom kiselinom. Mnogi od tih enzima danas su definirani kao ESBL, a prema molekularnoj podjeli pripadaju grupi A.

U podgrupu 2f svrstane su serinske karbapenemaze koje pripadaju molekularnoj grupi A. Osnovni su supstrat tih enzima karbapenemi, a bolje ih inhibira tazobaktam od klavulanske kiseline. Pojedini enzimi te grupe, poput SME i IMI-1, slabo hidroliziraju cefalosporine proširenoga spektra i izuzetno dobro aztreonam. SME porodica tih enzima kao i IMI-1 i

NMC-1-β-laktamaza predstavnici su kromosomalno kodiranih enzima 2f grupe. SME inačice opisane su u *Serratia marcescens* u SAD-u i u Francuskoj. Puno je veći problem plazmidski kodirana podgrupa 2f β-laktamaza u kojoj se nalaze KPC enzimi. U podgrupu 2f svrstani su i GES enzimi koji za sada ne predstavljaju veliki klinički problem iako su plazmidno kodirani jer ne pokazuju sposobnost epidemijskog širenja kao KPC. Izolati gram-negativnih bakterija koji luče karbapenemaze povezani su s izbijanjem brojnih epidemija u bolničkome okolišu, a danas su prošireni po cijelome svijetu.

Grupa 3 metalo-β-laktamaza (engl. *metallo-β-lactamases*, MBLs) obuhvaća jedinstvenu grupu enzima koji sadrže cink na aktivnome mjestu, a prema molekularnoj podjeli svrstani su u grupu B. Širokoga su spektra hidrolize koji obuhvaća peniciline, cefalosporine i karbapeneme, ali ne hidroliziraju monobaktame. Inhibirati ih možemo s EDTA, dipikolinič nom kiselinom ili 1,10-o-fenantrolinom, dok inhibitori poput klavulanske kiseline i tazobaktama na njih nemaju utjecaja. Klinički su najvažniji predstavnici te grupe VIM-1 i IMP-1.

Metaloenzimi grupe 3 dodatno su podijeljeni na tri molekularne podgrupe (podgrupa B1, B2 i B3), kao i na tri funkcionalne podgrupe 3a, 3b i 3c. Metalo-β-laktamaze prvotno su dokazane kao kromosomski kodirani enzimi gram-pozitivnih bakterija i pojedinih gram-negativnih bakterija, poput *Bacteroides fragilis, Bacillus cereus, Flavobacterium meningosepticum* ili *Stenotrophomonas maltophilia*. Broj im je ostao relativno trajan dugi niz godina. Nakon pojave MBLs kodiranih plazmidima, ti enzimi postaju podložniji evolucijskome pritisku unutar različitih nositelja, što je u konačnici dovelo do pojave brojnih jedinstvenih inačica tih enzima.

Grupa 4 uključena je u funkcionalnu podjelu još 1995. godine, no prema zadnjim podatcima smatra se da će članovi te grupe s vremenom, nakon bolje karakterizacije i više podataka o njihovim osobitostima, biti uključeni u već postojeće, prethodno nabrojane funkcionalne grupe i podgrupe. Zasad su u tu grupu svrstane penicilinaze koje ne inhibira klavulanska kiselina, a koje nisu svrstane ni u jednu grupu prema molekularnoj podjeli (11, 12, 13).

1.2.2. Molekularna podjela β-laktamaza

Molekularna podjela β-laktamaza temelji se na strukturnoj srodnosti, tj. slijedu nukleotida i aminokiselina u enzimima. Ambler je još 1980. godine podijelio β-laktamaze na temelju molekularne strukture (11). Prema njegovoj podjeli β-laktamaze svrstane su u četiri grupe (klase) označene slovima od A do D.

Enzimi svrstani u grupu A penicilinaze su koje uglavnom hidroliziraju peniciline i starije cefalosporine, ESBL enzimi koji hidroliziraju novije cefalosporine i karbapenemaze koje hidroliziraju peniciline, cefalosporine i karbapeneme. Ti enzimi mogu biti u potpunosti ili djelomično inhibirani klavulanatom ili tazobaktamom. Molekularna grupa A najveća je strukturno-evolucijska skupina unutar koje se nalazi najveći broj enzima iz Bush-Jacoby-Medeiroseve grupe 2. Intenzivne evolucijske promjene unutar enzima te grupe dovele su do velike strukturne šarolikosti enzima s brojnim porodicama i potporodicama. Pokazalo se da čak i minimalne strukturne raznolikosti rezultiraju velikim razlikama u biokemijskim svojstvima, spektru supstrata, otpornosti ili osjetljivosti na inhibitore i posljedično na fenotipske karakteristike rezistentnih patogena. Grupa A obuhvaća vrsno specifične i(ili) stečene β-laktamaze koje mogu biti konstitutivne ili inducibilne (13, 14, 15).

U grupu C svrstane su cefalosporinaze i AmpC β-laktamaze proširenoga spektra, a sve iskazuju bolju hidrolitičku aktivnost prema cefalosporinima nego prema penicilinima. U grupi D nalaze se oksacilinaze sposobne hidrolizirati kloksacilin i oksacilin, ali i široki spektar β-laktamaza koje mogu hidrolizirati karbapeneme, poput OXA-48 ili OXA-23. Enzimi iz grupa A, C i D hidroliziraju β-laktamski prsten antibiotika preko aktivnoga mjesta serina, dok metalo-β-laktamaze iz grupe B za hidrolizu koriste dvovalentne cinkove ione (Zn^{2+}). MBL enzimi iz grupe B iskazuju sposobnost hidrolize širokoga spektra antibiotika koji uključuje sve β-laktame osim aztreonama i ne mogu se inhibirati klavulanatom ili tazobaktamom. Iako ne hidroliziraju aztreonam, istraživanja su pokazala da aztreonam u većini slučajeva nije djelotvoran prema takvim izolatima koji često posjeduju dodatne ESBL enzime ili plazmidne AmpC β-laktamaze koje hidroliziraju monobaktame. MBL enzime inhibiraju kelatori metalnih iona poput EDTA, merkaptosumporna i merkaptopropionska kiselina koje inaktiviraju cink u aktivnom središtu enzima. Najpoznatiji su predstavnici te grupe NDM, VIM i IMP β-laktamaze.

Funkcionalna podjela omogućuje povezivanje različitih β-laktamaza s njihovom kliničkom aktivnošću jer pruža uvid u selektivnu rezistenciju prema različitim grupama β-laktamskih antibiotika. Funkcionalna je podjela subjektivnija od molekularne, ali je primjenjivija i praktičnija u kliničkoj interpretaciji osjetljivosti izolata na antibiotike.

Idealnu podjelu β-laktamaza koja usklađuje funkcionalne i strukturne (molekularne) osobitosti zasad predstavlja samo podjela metalo-β-laktamaza. Većina drugih β-laktamaza dobro su definirane temeljem sekvencije aminokiselina, ali s malo funkcionalnih i klinički

važnih podataka te bi nova podjela trebala uskladiti te dvije skupine informacija. Raznovrsnost β-laktamaza posljedica je njihova davnoga ishodišta. Za serinske se β-laktamaze procjenjuje da su prastari enzimi, razvijeni prije više od dvije milijarde godina, prije podjele mikroorganizama na gram-pozitivne i gram-negativne vrste. Budući da su prisutne u brojnim mikroorganizmima, podložne su raznovrsnim selektivnim pritiscima, no zahvaljujući izuzetnoj prilagodljivosti, iznašle su različite načine izbjegavanja djelovanja brojnih inhibitora kao i raznovrsno dizajnirane formulacije antibiotika osmišljenih upravo u svrhu onemogućavanja hidrolize enzimskom aktivnošću. Potreba za daljnjim osvježivanjem i usklađivanjem funkcionalne i molekularne podjela β-laktamaza nepobitna je činjenica. Uslijed brojnih mehanizama horizontalnoga prijenosa gena između bakterija te širenja na nove domaćine najviše profitiraju *bla* geni koji mogu postati dio višestruko otpornih (engl. *multiresistant*) plazmida koje već uobičajeno nalazimo u kliničkim izolatima. Takvo *promiskuitetno* širenje gena sigurno vodi daljnjemu razvoju novih inačica β-laktamaza te otkriću novih vrsta i mehanizama enzimski posredovane otpornosti na antibiotike (11, 12, 13, 14).

1.3. β-laktamaze proširenoga spektra (ESBL)

β-laktamaze proširenoga spektra (ESBL) enzimi su koje stvaraju pojedine gram-negativne bakterije, a ishodište im je u starijim vrstama β-laktamaza proširenoga spektra, poput TEM-1, TEM-2, SHV-1 i SHV-11 (15). Nastanak i uspješno širenje ESBL potječe iz ranih 80-ih godina prošloga stoljeća, nakon uvođenja cefalosporina treće generacije u kliničku primjenu. Izloženost bakterija širokome spektru β-laktamskih antibiotika inducirala je stalnu produkciju enzima i nastanak slučajnih mutacija posredovanih plazmidima te time proširila hidrolitički spektar β-laktamaza. Nakon takvih slučajnih mutacija posredovanih plazmidom iz osnovnih, progenitornih β-laktamaza (TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11), razvile su se enzimske ESBL mutante kakve danas najčešće nalazimo u kliničkim izolatima bolničkih i izvanbolničkih pacijenata. Osnovno ishodište TEM β-laktamaza još je uvijek neutvrđeno, ali danas znamo da su sve inačice TEM enzima nastale akvizicijom pokretnih gena (*bla* gen – β-laktamaza gen). SHV β-laktamaze specifične su za *Klebsiella pneumoniae*, a pokretni bla_{SHV} geni potomci su *prebjeglih* gena iz kromosoma te vrste. Mikroevolucije TEM i SHV β-laktamaza izuzetno su značajne i učestale te pokazuju eksponencijalni rast u brojnosti različitih inačica enzima u zadnjih tridesetak godina. Uslijed brzoga rasta novoprepoznatih polimorfnih supstitucijskih mjesta u aminokiselinskim sekvencijama uspostavljena je posebna mrežna stranica (www.lahey.org/studies/webt.asp.website) na koju se prijavljuju sve novo otkrivene inačice.

Broj novootkrivenih enzima i dalje će rasti jer su studije mutageneze ukazale na sposobnost 220 aminokiselinskih krajeva (od ukupno 263) TEM-1 β-laktamaze u podržavanju mutacijskih promjena uz istovremeno održanu sposobnost hidrolize ampicilina (15). Promjene u sekvencijama aminokiselina između ishodišnih enzima i nastalih mutanti iznosi svega 2 % sekvencije aminokiselina koje dovode do remodeliranja aktivnoga mjesta enzima, čime se povećava sposobnost hidrolize brojnih β-laktamskih antibiotika. Prva ESBL, cefotaksimaza, otkrivena 1983. godine i nazvana SHV-2, otkrivena je nedugo nakon uvođenja cefotaksima u kliničku praksu, a od ishodišne SHV-1 razlikuje se samo u zamjeni glicina serinom na poziciji 238. Godinu dana kasnije, 1984.godine, otkrivena je TEM-3, također cefotaksimaza koja se od TEM-2 razlikuje u dvjema zamijenjenim aminokiselinama – na položaju 104 glutaminska kiselina zamijenjena je lizinom, a na položaju 238 glicin je zamijenjen serinom (14, 15). Smještaj je većine navedenih pozicija u neposrednoj blizini oksi-anionskoga, enzimski aktivnoga *džepa* koji se nalazi na granici između dvaju glavnih područja molekula grupe A β-laktamaza (15).

Promjene na pozicijama 238, 164 i 179 čine se najznačajnijima za ESBL aktivnost i prisutne su u većini TEM i SHV tipova ESBL enzima. Najčešća je i najbolje proučena mutacija mutacija baznih parova aminokiselina koji kodiraju G238S amino-acidnu zamjenu. U prirodnim uvjetima zamjena glicina serinom, alaninom i asparaginom doprinosi rezistenciji na cefalosporine proširenoga spektra djelovanja (engl. *extended-spectrum-cephalosporins*, ESC). U kliničkim izolatima dosad su prepoznate 33 TEM i 25 SHV β-laktmaza inačica sa zamjenskom Gly238Ser. Tijekom 2003. godine utvrđena je kristalografska struktura SHV-2 koja u usporedbi sa SHV-1 iskazuje razliku samo u G238S supstituciji (15, 16, www.lahey.org/studies/webt.asp.website). Prema broju inačica na položajima 238, 164 i 179 te raznovrsnosti sekvencija pripadajućih gena očito je da je svaka pojedinačna mutacija nastala u mnogobrojnim, međusobno nezavisnim prilikama.

Lučenjem ESBL enzima gram-negativne bakterije onemogućuju antimikrobno djelovanje penicilina i starijih cefalosporina, cefalosporina proširenoga spektra (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson) i monobaktama (aztreonam) (17). Prema Amblerovoj podjeli na temelju slijeda aminokiselina pripadaju grupama A i D β-laktamaza (11, 13). ESBL hidroliziraju široki spektar penicilinskih i cefalosporinskih antibiotika te monobaktama. Aktivnost ESBL enzima onemogućuju inhibitori β-laktamaza, poput klavulanske kiseline, sulbaktama i tazobaktama na koje su uglavnom osjetljive (17, 18). ESBL enzime najčešće nalazimo kod izolata *E. coli* i *K. pneumoniae*, ali se mogu javljati i kod drugih rodova iz porodice *Enterobacteriaceae*,

poput *Enterobacter, Salmonela, Shigella, Proteus, Citrobacter, Providencia, Serratia* te kod nefermentora, poput *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia* i *Capnocytophaga* (19). Molekularnom analizom specifičnih sekvenci aminokiselina bla_{ESBL} gena otkriveno je oko 300 različitih ESBL enzima svrstanih u devet porodica među kojima su najčešće TEM (> 160) i SHV (> 100) porodice s dinamičnim rastom CTX-M (> 10) i OXA (> 10) porodica β-laktamaza (10, 15).

S obzirom na ukupnu hidrolitičku aktivnost svih porodica razlikujemo tri tipa aktivnosti: β-laktamaze širokoga spektra, β-laktamaze proširenoga spektra i inhibitor-rezistentne β-laktamaze (15). β-laktamaze proširenoga spektra (ESBL) najuspješniji su rezultat mikroevolucije i trebamo ih promatrati više kao nadogradnju i usavršavanje postojećih svojstva ishodišnih enzima nego kao nešto potpuno novo. Njihova uspješnost posljedica je istovremenoga usavršavanja postojećih svojstva i zadržavanja prethodno prisutnih, što je rijetkost kod drugih tipova β-laktamaza (15, 17, 18, 19). Smanjena aktivnost prema penicilinu koja prati mutacijske promjene ESBL enzima dobar je primjer kompromisa između različitih uloga proteina. Građevne promjene koje prate mutacije često dovode do strukturnih manjkavosti koje mogu utjecati na raznovrsne aktivnosti proteina i stabilnost enzima, što ovdje nije slučaj. Prirodne mutacije koje dovode do nastanka ESBL inačica nisu jedini činitelji koji utječu na enzimski posredovanu otpornost prema antibioticima, već mogu biti uključena i druga svojstva, poput smanjene propusnosti vanjske membrane (15, 17, 18). Drugi način onemogućavanja djelotvornosti antibiotika pojačavanje je ekspresije ESBL enzima uslijed mutacija regulatornoga dijela DNK (promotora), njegovom zamjenom (npr. mutacije koje su unesene insercijskim sekvencijama, IS), povećanjem broja kopija bla_{ESBL} gena ili povećanjem broja plazmida koji kodiraju ESBL. Raznovrsne kombinacije navedenih činitelja odgovorne su za široke raspone minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) β-laktamskih antibiotika kod kliničkih izolata sa samo jednom mutacijskom promjenom. Takvi slučajevi uočeni su na primjerima ESBL producirajućih izolata iste vrste u istoj ustanovi gdje MIK-ovi za širokodjelujuće cefalosporine (engl. *extended spectrum cephalosporins*, ESC) mogu varirati od 1 do 32 mg/L za cefotaksim i od 0,5 do 16 mg/L za ceftazidim (20). Treći način povećanja otpornosti nastaje uslijed mutacije na pozicijama Glu240 i Glu104. U prirodnim TEM i SHV enzimima najčešće dolazi do zamjene Glu240 lizinom (Glu240Lys) ili vrlo rijetko argininom. Mutacije na poziciji 104 dokazane su samo unutar TEM porodice enzima i u svima je glutaminska kiselina zamijenjena lizinom (Glu104Lys). Mutacija na poziciji 104 najčešća je razlikovna osobitost između raznovrsnih inačica TEM enzima, što upućuje na

međusobno nezavisnu prirodnu selekciju. Vrste enzima s mutacijama na poziciji 104 uglavnom koegzistiraju s mutacijama Gly238 ili Arg164 u čak 36 inačica od 41 poznate inačice. Dok pojedine od opisanih mutacija posljedično dovode do veće *potentnosti* ESBL enzima, druge smanjuju osjetljivost na inhibitore ovisne o mjestu (IR tip mutacija). Takva vrsta mutacija najčešće se javlja na pozicijama 69, 130, 187, 224 275 i 276 TEM i SHV enzima, utječe na smanjenje hidrolitičke aktivnost TEM-1 prema penicilinima i cefalosporinima uskoga spektra te istovremeno pojačava aktivnost ESBL enzima. Kombinacija ESBL i IR mutacija rezultira nastankom tzv. *složenca mutiranih enzima* (engl. *complex mutant enzymes*); poznato ih je desetak. U usporedbi s ishodišni enzimima koji nose samo po jednu od navedenih mutacija ili u usporedbi s klasičnim ESBL enzimima uočavamo kompromise u ispoljavanju jednoga svojstva ili obaju svojstava. Tako npr. TEM-89 i SHV-10 nemaju ESBL aktivnost, ali su otporni na inhibitore, TEM-125 ima slabu ESBL aktivnost i jako izraženu otpornost prema inhibitorima, dok TEM-50 posjeduje kombinaciju obaju svojstava koja se umjereno ispoljavaju (15).

1.3.1. Vrste β-laktamaza proširenoga spektra (ESBL)

β-laktamaze proširenoga spektra (ESBLs) uglavnom su derivati TEM-1 i TEM-2 (plazmidno kodirane β-laktamaze *E. coli*) i SHV-1 (kromosomski kodirani enzimi *K. pneumoniae*). Međutim, u zadnjemu desetljeću CTX-M β-laktamaze inačica su ESBL u trajnome rastu. Prvi ESBL producirajući izolati enterobakterija dobiveni su iz uzoraka bolničkih pacijenata i najčešće su pripadali vrsti *K. pneumoniae*. ESBL producirajući izolati izvanbolničkih pacijenata uglavnom su pripadali vrsti *E. coli* (21, 22, 23, 24). Prema definiciji ESBL pripadaju molekularnim grupama A i D β-laktamaza, a prema nadopunjenoj Bush-Jacobyjevoj podjeli iz 2010. godine svrstane su u prethodno opisane četiri podgrupe grupe 2 (2be, 2ber, 2de i 2e) (13).

TEM β-laktamaze najčešće su β-laktamaze gram-negativnih bakterija čije je primarno ishodište još uvijek nepoznato. Otpornost *E. coli* na ampicilin posredovana je produkcijom TEM-1 koji je odgovoran i za otpornost *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae* na penicilin i ampicilin. TEM-2 nastala je od TEM-1 zahvaljujući samo jednoj točkastoj mutaciji koja je dovela do pomicanja izolelektrične točke (pI) od 5,4 na 5,6 bez promjene supstratnoga profila te su ta dva enzima alelski blizanci. Obje alelske varijante kodiraju lučenje β-laktamaza uskoga spektra djelovanja. Zamjena aminokiselina na aktivnim mjestima Glu104Lys i Gly238Ser uzrokovala je nastanak prvoga TEM enzima s osobinama β-

laktamaza proširenoga spektra – TEM-3. Točkaste mutacije dovode do promjena u strukturi aktivnoga središta tako da velike molekule kao što su oksimino-cefalosporini mogu ući u aktivno središte enzima gdje potom budu hidrolizirani. Danas poznajemo oko 160 TEM enzima od kojih su neki otporni na inhibitore i svrstani u grupu β-laktamaza proširenoga spektra (4, 10, 25). Inhibitor-otporne (engl. *inhibitor-resistant TEM ß-lactamases*, IRT TEM) nisu ESBL, a nastale su ranih 90-ih godina 20. stoljeća kao odgovor bakterijskih sojeva na uvođenje inhibitora β-laktamaza u kliničku praksu (26). Takve β-laktamaze otporne su na kombinacije antibiotika i inhibitora, poput klavulanata, tazobaktama i sulbaktama, ali slabo hidroliziraju cefalosporine proširenoga spektra. Novije otkrivene mutante, poput TEM-68, predstavljaju kombinaciju ESBL i IRT fenotipova te pokazuju otpornost na inhibitore i bolju hidrolizu cefalosporina proširenoga spektra (26, 27).

SHV β-laktamaze kromosomski su kodirane β-laktamaze širokoga spektra. SHV-1 β-laktamaza odgovorna je za intrinzičku rezistenciju izolata *K. pneumoniae*. Ostale vrste iz porodice enterobakterija također produciraju SHV-1 β-laktamaze, ali su kod njih kodirane plazmidno. Strukturna građa SHV-1 i TEM-1 istovrsna je u 68 % ukupnoga slijeda aminokiselina. Točkaste mutacije unutar *bla*$_{SHV}$ gena odvijaju se na manjemu broju aminokiselinskih krajeva nego kod TEM β-laktamaza i najčešće su na pozicijama 238 i 240. Mutante poput SHV-5 (Gly238Ser) i SHV-12 (Glu240Lys) među klinički su najraširenijima ESBL inačicama osnovnih SHV-1 i SHV-11 enzima. Prema učestalosti javljanja slijede ih mutacije na pozicijama 104 i 164 koje u kombinaciji s prethodno navedenima, osim dobre hidrolize oksimino-β-laktama, iskazuju i svojstvo dobre hidrolize ceftazidima. Većina SHV inačica, poput TEM ESBL, bolje hidrolizira ceftazidim u odnosu na cefotaksim i ceftriakson te prema supstratnom profilu pripadaju ceftazidimazama (15, 24).

CTX-M β-laktamaze rastuća su grupa plazmidski posredovanih enzima koji pripadaju molekularnoj grupi A kao i SHV i TEM enzimi. Prema funkcionalnoj podjeli svrstane su u podgrupu 2be (11, 13). CTX-M s TEM i SHV β-laktamazama dijele svega 40 % slijeda aminokiselina, a smatra se da im je ishodište kromosomalni ampC gen vrsta iz roda *Kluyvera* i to *K. ascorbata* i *K. georgiana*. Najčešće ih luče izolati *E. coli, K. pneumoniae i Salmonella enterica* serovar Typhimurium, a rjeđe ostale vrste enterobakterija (10). Prva opisana CTX-M β-laktamaza (CTX-M-1) potječe iz *E. coli*, a otkrivena je u Njemačkoj (München) 1989. godine. Nakon toga otkrivena je u izolatima *E. coli* s područja Argentine i Japana. U vrlo kratkome razdoblju proširila se po svim kontinentima. Do danas poznajemo tridesetak inačica toga enzima (5, 28, 29). CTX-M-1 iskazivala je svojstvo jake hidrolize cefotaksima za razliku

od većine enzima iz TEM i SHV grupa. Njezina inačica, CTX-M-3, otkrivena je 1996. godine u Poljskoj kod raznovrsnih enterobakterija. Brojne studije ukazuju na gensku šarolikost CTX-M enzima u različitim državama (30, 31, 32). Nova vrsta CTX-M enzima uočena je 2003. godine u Indiji i nazvana je CTX-M-15. Ta alelska inačica proširila se diljem svijeta i danas je najčešći tip ESBL enzima u većini zemalja. Za razliku od TEM i SHV enzima učinkovito hidrolizira ceftazidim. Učestalo se pojavljuje kod izvanbolničkih izolata *E. coli* koji ispoljavaju izuzetnu sposobnost širenja na bolničku populaciju (31, 32). Iako su srodne inačice CTX-M enzima, poput CTX-M-14 i CTX-M-27 opisane u azijskim zemljama još krajem 90-ih godina prošloga stoljeća, CTX-M-15 postala je svjetski najrasprostranjenija β-laktamaza zastupljena na svim kontinentima (33). Nešto više od 70 CTX-M enzima genski je definirano temeljem aminokiselinskoga slijeda, a svrstani su u 5 grupa – CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (23).

CTX-M dobro hidroliziraju većinu oksimino-cefalosporina i cefepim, ali su manje uspješne u hidrolizi ceftazidima. Prilikom testiranja izolata za dokazivanje produkcije ESBL enzima potrebno je uz ceftazidim testirati i cefotaksim da bi se smanjila vjerojatnost neprepoznavanja CTX-M enzima. Novi članovi ove brzo rastuće skupine enzima, evoluirali su zahvaljujući točkastim mutacijama koje su dovele do Asp240Gly ili Pro167Ser zamjene na amino kraju. Izolati s navedenim mutacijama fenotipski iskazuju povećanje otpornosti na ceftazidim i bolju osjetljivost na cefepim, a evoluirale su uslijed selektivnoga pritiska primjenom ceftazidima. Nijedna od navedenih zamjena na aminokiselinskim krajevima ne postoji u prirodnim TEM ili SHV β-laktamazama, što upućuje na poseban evolucijski potencijal CTX-M enzima (34, 35).

OXA β-laktamaze rastuća su grupa enzima koja je u samim početcima otkrivanja raznovrsnih β-laktamaza bila proširena među izolatatima *Pseudomonas aeruginosa* s područja Turske i Francuske. OXA enzimi nađeni su među izolatima roda *Acinetobacter* i u početku rijetko među različitim enterobakterijama (36). S obzirom na to da istovjetnost slijeda aminokiselina među članovima OXA grupe iznosi 20 % – 30 % sekvencije smatralo se da predstavljaju fenotipsku grupu, ali ne i genotipski srodne inačice. Danas se pripadnost OXA grupi određuje uglavnom prema konzerviranim aminokiselinskim sljedovima, a ne prema funkcionalnim karakteristikama. Većina novootkrivenih OXA nastala je zahvaljujući točkastim mutacijama OXA-2 i OXA-10 enzima (13, 37, 38). Brzina nastanka novih inačica i izuzetno brzo širenje smjestili su ih u drugu prema veličini porodicu β-laktamaza. Prema dopunjenoj podjeli β-laktamaza prema K. Bush i temeljem aktivnosti prema supstratima svrstane su u podgrupe 2d, 2de i 2 df. Skupina 2df sadrži kromosomski kodirane β-laktamaze roda *Acinetobacter* i

plazmidski kodirane β-laktamaze enterobakterija. Neke oksacilinaze imaju izraženu aktivnost prema karbapenemima te se nazivaju karbapenem-hidrolizirajuće oksacilinaze. Tipične su za vrstu *Acinetobacter baumannii* i svrstane su u *OXA-23-like*, *OXA-40-like*, *OXA-58-like*, *OXA-143-like* i OXA-258 grupu. U enterobakterija nalazimo OXA-48 karbapenemazu koja je u rastu diljem svijeta i sve više istiskuje KPC i metalo-β-laktamaze. Izuzetno brzo širenje OXA enzima među različitim vrstama enterobakterija, poput *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella pneumoniae*, posljedica je upravo plazmidski smještenog bla_{OXA} gena. OXA β-laktamaze otporne su na ampicilin i cefalotin, hidroliziraju oksacilin i kloksacilin, a osim OXA-18 slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom. Najviše je zabrinjavajuća značajka te skupine enzima sposobnost hidrolize karbapenema (13).

1.3.2. Ostale ESBL

Novija je porodica ESBL enzima svrstana u grupu A GES enzimi (engl. *Guiana extended-spectrum β-lactamases*), prethodnoga imena IBC enzimi (engl. *integron-borne ephalosporinases*). Otkriveni su u Francuskoj 1998. godine, ali s ishodištem u nekadašnjoj Francuskoj Gvajani (15,39). Kodirani su *kazetnim* genima smještenim u plazmidskim integronima vrste *Pseudomonas aeruginosa* i raznovrsnih enterobakterija. GES-1 otkriven je kod vrste *Klebsiella pneumoniae* u Francuskoj 2000. godine. GES-2 inačica, nastala mutacijom GES-1, opisana je u izolastu *P. aeruginosa* u Južnoj Africi i pripada karbapenemazama. Nakon toga otkrivene su još dvadeset dvije inačice koje se međusobno razlikuju po jednoj aminokiselinskoj zamjeni ili najviše tri. Ovisno o vrsti zamjene aminokiselina enzimi pokazuju različite sposobnosti hidrolize β-laktama i osjetljivosti na inhibitore. U izolatu *E. coli* pacijenta iz Grčke 2004. godine otkriven je bla_{GES-5} gen koji je kasnije otkriven i u izolatima *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Pseudomonas aeruginosa* (40).

Osim GES enzima otkriveni su i brojni enzimi ESBL osobitosti, ali bez srodnosti s ijednom od prethodno navedenih grupa. PER-1 (engl. *Pseudomonas extended-resistance*) β-laktamaza otkrivena je u Turskoj kod izolata *Pseudomonas aeruginosa*, zatim kod izolata *Salmonella enterica* serovar Typhimurium i potom kod izolata vrste *Acinetobacter baumannii* (41, 42). Na području Turske 46 % bolnički izoliranih acinetobaktera i 11 % pseudomonasasa luče PER-1. PER-2 koja dijeli 86 % istovrsnoga slijeda aminokiselina s PER-1 otkrivena je kod prethodno nabrojanih vrsta, ali i kod *E. coli*, *K. pneumoniae, Proteus mirabilis* i *Vibrio cholerae* O1 *El Tor*. PER vrste enzima dijele svega 25 % – 27 % istovrsnoga slijeda

aminokiselina s TEM i SHV enzimima, a izuzev Turske proširene su i u Francuskoj (43). Ostale, neuobičajene grupe ESBL enzima, poput BES-1, CME-1, VE-B-1, PER, SFO-1, prijavljene su širom svijeta te ukazuju na veliku raznovrsnost enzima kao i vrlo brzu sposobnost prilagodbe mikroorganizama različitim supstratima i inhibitorima.

1.4. AmpC β-laktamaze

Otkriće cefalosporina proširenoga spektra, poput cefotaksima i ceftriaksona, uspješnih u terapiji infekcija uzrokovanih enterobakterijama i ceftazidima, koji osim na enterobakterije djeluje i na *Pseudomonas aeruginosa*, dovelo je do kratkotrajnoga predaha u potrebi pronalaženju novih antibiotika. Međutim, ubrzo je otkriveno da ulogu u razvoju rezistencije na antibiotike ima i aktivacija (derepresija) već postojećih, inducibilnih, kromosomski kodiranih β-laktamaza koje su danas svrstane u grupu C β-laktamaza. Ta grupa enzima hidrolizira oksimino-cefalosporinske antibiotike koji su međutim slabi poticatelji (induktori) same sinteze enzima. Ti enzimi ostaju aktivni onoliko dugo koliko traje sama indukcija, tj. prisutnost β-laktamskog antibiotika. Osobitost im je neosjetljivost na inhibitore (klavulanat, tazobaktam) osim vrste *Morganella morganii* koja pokazuje osjetljivost na tazobaktam. Osjetljivost na cefalosporine četvrte generacije, poput cefepima, ostaje očuvana. Selekcijski pritisak antibiotika dovodi do kolonizacije pacijenta takvim izolatima te on postaje ishodište prijenosa na druge korisnike zdravstvenih ustanova.

Danas je oko 30 % izolata *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella* spp. u bolničkome okolišu derepresirano i otporno na oksimino-cefalosporine već pri prvome testiranju. Brzo širenje toga tipa otpornosti među enterobakterijama posljedica je *bijega* bla_{AmpC} gena s kromosoma na plazmide (*p*AmpC) te njihovo širenje na raznovrsne enterobakterije. Smještaj gena na plazmidima osigurava trajnu proizvodnju enzima budući da su plazmidi lako pokretne i prenosive jedinice koje se jednostavno šire između bakterija iste vrste (vertikalni prijenos) ili bakterija različitih vrsta (horizontalni prijenos). Lako prenosivi plazmidi (engl. *transmissible plazmids*) sadrže stečene gene za AmpC enzime i mogu biti uneseni u enterobakterije koje inače iskazuju slabu ekspresiju kromosomalnih bla_{AmpC} gena (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*). Istovremena prisutnost kromosomski i plazmidski kodiranih AmpC enzima poboljšava uspješnost hidrolize cefalosporina širokoga spektra (44, 45). AmpC enzimi svrstani su u porodice CMY, MIR, BIL, FOX i DHA koje pripadaju molekularnoj klasi C prema Ambleru (11, 13, 45). Iako su plazmidski posredovani, AmpC enzimi još su uvijek manje učestali od ESBL enzima, često su endemski prisutni na ograničenim zemljopisnim

područjima i neprekidno se otkrivaju nove inačice (44, 45). Izolati enterobakterija mogu istovremeno posjedovati *bla*$_{\text{ESBL}}$ i *bla*$_{\text{AmpC}}$ gene koji u kombinaciji s gubitkom porina dovode do otpornosti na karbapeneme (46). AmpC β-laktamaze najčešće uočavamo kod članova porodice enterobakterija pod akronimom *SPACE* a čine ga *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* i *Enterobacter*.

1.5. Karbapenemaze

β-laktmaze proširenoga spektra (ESBLs) ne hidroliziraju karbapenemske antibiotike i oni su lijek izbora za takve izolate. Povećanje prevalencije ESBL izolata posljedično dovodi do veće potrošnje karbapenema, što utječe na nastanak mutacija i na plazmidima i na kromosomima pa takvi mutirani bakterijski izolati počinju izlučivati enzime tipa karbapenemaza koji hidroliziraju karbapeneme. Najčešće ih nalazimo kod enterobakterija i nefermentativnih vrsta, poput *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii.* Karbapenemaze dijelimo na tri grupe, i to na grupu A (GES, KPC, SME, IMI, NMC), grupu B (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, DIM, AIM) i grupu D (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58, OXA-143) (47).

Unutar grupe A karbapenemaza značajno mjesto ima plazmidski kodirana *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza (engl. *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (*KPC*)-*Producing Bacteria*). Taj je enzim prvi put otkriven u izolatima *K. pneumoniae* u Južnoj Karolini (SAD) 1996. godine. Ubrzo su se izolati *K. pneumoniae* srodnih enzimskih osobitosti proširili po cijelom svijetu. Unutar KPC grupe utvrđene su tri vrste enzima koji se međusobno razlikuju po zamjeni jedne aminokiseline ili njih dviju. KPC-1 β-laktamaza nađena je u izolatima iz Južne Karoline, KPC-2 otkrivena je u izolatima *Klebsiella* s područja Baltimorea i KPC-3 dokazana u izolatima s područja New Yorka. Enterobakterije koje produciraju tu vrstu karbapenemaza postale su značajni činitelj otpornosti na antibiotike u velikome broju država u SAD-u (47). GES enzim iz grupe A karbapenemaza prvi je put dokazan u izolatu *K. pneumoniae* u Francuskoj 1998. godine (48). SME enzim grupe A izoliran je 1982. godine u izolatima *Serratia marcescens* u Londonu, IMI enzim dokazan je 1984. godine u SAD-u u izolatima *Enterobacter cloacae*, a NMC enzim 1990. godine u Francuskoj (49).

Grupa B karbapenemaza sadrži najčešće dokazane IMP (engl. *imipenemases*) i VIM (engl. *Verona integron-encoded metallo-ß-lactamases*) porodice enzima. IMP-1 opisan je 1990. godine u Japanu u izolatima *Pseudomonas aeruginosa*, a IMP-2 u Italiji 1992. godine u izolatima *Acinetobacter baumannii.* VIM porodica ima zasad preko 50 alelskih inačica otkrivenih u brojnim državama Europe, Sjeverne Amerike i Azije. VIM-1, prva od otkrivenih

članica te porodice, opisana je u Italiji 1996. godine. SPM-1 (engl. *Sao Paulo metallo-ß-lactamases*) dokazana je u Brazilu u izolatima *P. aeruginosa,* GIM-1 (engl. *German imipenemases*) opisana je u Njemačkoj 2002. godine, SIM-1 (engl. *Seoul imipenemases*) opisana je u izolatima *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. GIM enzim ima dva iona cinka u aktivnom središtu i po tome se rezlikuje od ostalih metalo-β-laktamaza. *bla*$_{SPM}$ gen nije inkorporiran u integron pa se SPM-1 širi isključivo vertikalno. Ta vrsta enzima nije proširena izvan Brazila osim nekoliko dokazanih, importiranih slučajeva u Švicarskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. NDM-1 (engl. *New Delhi metallo-ß-lactamases*) opisana je 2009. godine u Švedskoj u izolatu *K. pneumoniae* od bolesnika koji se prethodno liječio u Indiji (47, 48, 49).

Grupa D karbapenemaza (oksacilinaze)**,** kao što je navedeno u prethodnome poglavlju (1.4.1.), pokazuju otpornost na ampicilin i cefalotin, hidroliziraju oksacilin i kloksacilin, a osim OXA-18 slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom. Osnovna zabrinjavajuća značajka nekih članova te skupine sposobnost je hidrolize karbapenema (13). Najveći broj enzima te grupe pronađen je u rodu *Acinetobacter* u vrsti *Acinetobacter baumannii*. OXA-2 i OXA-10 svrstane su u usko spektralne enzime grupe D karbapenemaza i dominiraju u vrsti *Pseudomonas aeruginosa*. Pretpostavlja se da je većina ostalih OXA tipova enzima nastala točkastim mutacijama OXA-2 i OXA-10 enzima (37,38). Novije studije ukazuju na različitu antimikrobnu aktivnost tih enzima ovisno o nositelju. Kada su prisutni u *E. coli*, ponašaju se kao β-laktamaze uskoga spektra, a ako su prisutne unutar vrste *Acinetobacter baumannii*, ponašaju se kao karbapenemaze i iskazuju otpornost na karbapeneme. Na temelju tih saznanja smatra se da i ostali enzimi grupe D mogu biti svrstani u karbapenemaze. Osim OXA-48, enzima koji pretežno cirkulira unutar vrsta *K. pneumoniae* i *Enterobaacter cloacae*, većina klinički važnih enzima iz grupe D karbapenemaza prisutna je u vrsti *Acinetobacter.* Izuzetno brzo širenje OXA enzima u populaciji enterobakterija i posljedično povećanje otpornosti na karbapeneme predstavlja terapijski izazov u liječenju takvih infekcija s dvojbenim ishodom antimikrobne terapije (50).

1.6. Epidemiologija ESBL

1.6.1. Zemljopisna rasprostranjenost ESBL izolata

Od početka 1990-ih godina broj novootkrivenih β-laktamaza značajno raste, a prevalencija im se razlikuje ovisno o zemljopisnome području. Prvi klinički ESBL izolati otkriveni su u Njemačkoj i Ujedinjenom Kraljevstvu, ali najveći broj u istome periodu otkrivenih β-laktamaza potječe s područja Francuske. Prvi epidemijski val infekcija uzrokovanih ESBL

producirajućim izolatima počeo je u Francuskoj još 1986. godine te je do polovice 1990-ih 25 % – 35 % bolničkih infekcija bilo uzrokovano ESBL izolatima *K. pneumoniae* (14, 25, 51). Kontinuirano praćenje prevalencije infekcija uzrokovanih ESBL izolatima pokazalo je veliku razliku između europskih država ovisno o položaju (sjever – jug; istok – zapad), ali i unutar regija pojedinih zemalja. Najviše stope prevalencije ESBL prisutne su u zemljama južne i istočne Europe, a najmanje u skandinavskim zemljama. Podatci dobiveni studijom *MYSTIC* (engl. *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) ukazali su na povećanje ESBL producirajućih izolata *E. coli* u razdoblju od 1997. do 2006. godine s 2,1 % na 10,8 % (52). Praćenje invazivnih izolata *E. coli* (izolata iz hemokultura i likvora) putem EARSS mreže (engl. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System-net*) i putem *TESSy* sustava *ECDC* (engl. *The European Surveillance System*; *European Centre for Disease Prevention and Control*) na godišnjoj bazi, ukazalo je na povećanje ESBL izolata s manje od 1 % u 2001. godini do blizu 40 % u 2015. godini. Prema tim podatcima učestalost invazivnih izolata ESBL *E. coli* kreće se od 1,7 % na Islandu do 38,5 % u Bugarskoj. Značajno povećanje broja ESBL izolata uočeno je u dvanaest europskih zemalja, i to u Belgiji, Hrvatskoj, Češkoj, Francuskoj, Grčkoj, Irskoj, Italiji, Litvi, Norveškoj, Portugalu, Sloveniji i Švedskoj. Učestalost izolacije ESBL producirajuće *E. coli* iz hemokultura na području Hrvatske povećala se s 2 % u 2001. godini na 25 % u 2015. godini (52).

Na području Jugoistočne Azije i Pacifika učestalost ESBL producirajuće *E. coli* (neovisno o anatomskome mjestu izolacije) iznosila je od 35 % do 42 %, u Indiji 79 % a u Kini 54 % (54). Podatci su dobiveni provođenjem *SMART* studije (engl. *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) tijekom prvoga desetljeća ovoga stoljeća. Već tada je 10 % intraabdominalnih izolata *E. coli* bilo ESBL pozitivno (54). Osnovno je ishodište širenja tih izolata koloniziran probavni sustav. Podatci iz Španjolske pokazali su dramatično povećanje u kolonizaciji probavnoga sustava ESBL izolatima u periodu od 1991. do 2003. s učestalošću manjom od 1 % na 12 % hospitaliziranih pacijenata te s manje od 1 % na 5 % u izvanbolnički dobivenim uzorcima. Rezultati studije provedene u Izraelu pokazali su da čak 11 % novozaprimljenih pacijenata nosi ESBL producirajuće izolate u probavnome sustavu (54). Prema rezultatima provedenih studija jasno se uočava povezanost potrošnje antibiotika u nekoj sredini sa stopom rezistencije i učestalošću pojavnosti ESBL izolata. Međutim, kod ekstraintestinalne *E. coli* velik značaj ima pripadnost klonalnoj grupi unutar koje se nalaze i rezistentni pripadnici te vrste (55, 56).

1.6.2. Molekularna epidemiologija ESBL producirajuće *E. coli*

Razvojem molekularne biologije, a time i mikrobiologije, fenotipske metode koje su dugi niz godina služile za dokazivanje prisutnosti specifičnih vrsta otpornosti kod kliničkih izolata danas uglavnom koristimo samo za probir izolata. U fenotipske metode ubrajamo biotipizaciju, serotipizaciju i rezultate testiranja osjetljivosti izolata na antibiotike, ali nijedna od navedenih metoda nema mogućnost preciznoga razvrstavanja mikroorganizama prema tipu otpornosti (57). Kako bi se izolati točno razlučili, danas se već rutinski najčešće koriste molekularne metode, poput PFGE (engl. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) kromosomske DNK. Koriste se i druge inačice metode lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (58, 59). Zahvaljujući spoznaji da se svojstvo lučenja ESBL s jedne na drugu bakterijsku stanicu prenosi najčešće plazmidima, tijekom provođenja epidemioloških studija potrebno je izvršiti karakterizaciju bla_{ESBL} gena i analizu plazmida (60-64). Kao što je prethodno navedeno, većina ESBL enzima dijeli se na tri osnovne skupine: TEM, SHV i CTX-M tip enzima. *E. coli* i *K. pneumoniae* najčešći su nositelji toga svojstva među kliničkim izolatima, no i ostale vrste enterobakterija i pojedini nefermentori pokazuju sposobnost produkcije ESBL enzima. Zbog neprekidnoga povećanja broja novootkrivenih β-laktamaza i brzoga stvaranja rezistencije na *nove* antibiotike Američko društvo za zarazne bolesti uvrstilo je *E. coli i K. pneumoniae* u popis šest ciljnih mikroorganizama uzročnika infekcija za koje postoji hitna potreba pronalaska novih antimikrobnih terapeutika (65).

E. coli istovremeno je fiziološki dio crijevne mikroflore (mikrobiote) čovjeka, ali i najčešći uzročnik nekompliciranih uroinfekcija na koje se troši značajna količina antibiotika. Učestali antimikrobni pritisak dovodi do širenja rezistentnih klonova u izvanbolničkoj populaciji, a tijekom vremena isti ili srodni klonovi prenose se na populaciju bolničkih pacijenata i u ostale vrste zdravstvenih ustanova, poput tercijarnih ustanova i domova za starije i nemoćne (66). Krajem zadnjega desetljeća 20. stoljeća opisano je naglo širenje klona *E. coli* koje se MLST metodom (engl. *Multilocus Sequence Typing*) opisuje kao ST131. Širenje toga klona opisano je u različitim dijelovima svijeta istovremeno s uočenim povećanjem otpornosti *E. coli* na antibiotike. Pripadnici toga klona čine najveći udio među izolatima *E. coli* kao uzročnika pijelonefritisa (67, 68). Istraživanjem genoma *E. coli* EC958 koja je dominantni predstavnik ST131 klona utvrđeno je 56 gena odgovornih za rezistenciju na humani serum, što je jedan od bitnih činitelja koji utječu na povećanje virulencije i uspješnost širenja takvih izolata (69). Članovi ST131 klona pripadaju filogenetskoj grupi B2 čiji članovi nose brojne činitelje

virulencije i veći broj gena koji kodiraju otpornost na antibiotike, poput kotrimoksazola, fluorokinolona i β-laktama. Većina ST131 izolata u Ujedinjenom Kraljevstvu proizvodi CTX-M-15 β-laktamazu proširenoga spektra (70).

Povećanje otpornosti na cefalosporine uočeno u zadnjemu desetljeću najvjerojatnije je posljedica velike potrošnje cefalosporina u izvanbolničkoj sredini (71). Najčešći mehanizam otpornosti *E. coli* na cefalosporine 3. i 4. generacije još je uvijek proizvodnja β-laktamaza proširenoga spektra (ESBL) iako se zadnjih godina povećava broj izolata *E. coli* koji stječu plazmidne ampC β-laktamaze (*p*AmpC). AmpC izolati prvi su put opisani u Hrvatskoj 2003. godine, ali su tijekom dužega perioda bili samo sporadično prisutni. Zadnjih su godina sve češći u kliničkim izolatima (72, 73).

Proširenost ESBL enzima (TEM, SHV i CTX-M) razlikuje se prema zemljopisnim područjima, no većina ESBL enzima prepoznata je u europskim zemljama već početkom 80-ih godina 20. stoljeća. Prvi, izvorni TEM tip ESBL (TEM-1) rasprostranjen je među brojnim vrstama enterobakterija dok se SHV-1 ESBL tip β-laktamaza najčešće dokazuje kod izolata vrste *K. pneumoniae*. TEM i SHV tipovi ESBL enzima prvi su put dokazani među njemačkim i francuskim izolatima *K. pneumoniae* dok je CTX-M istovremeno utvrđen u Njemačkoj, Argentini, Francuskoj i Italiji. Zanimljivo je da je taj tip ESBL enzima prvi put dokazan već 1986. godine u Japanu u kliničkome izolatu *E. coli.* Do kraja 20. stoljeća u Europi su učestaliji tipovi TEM i SHV β-laktamaza. Njihova prisutnost u izolatima iz europskih zemalja ukazuje na trajnu perzistenciju i istovremenu evoluciju enzima na području Europe. Pojava novih inačica dovodi do povremenih epidemijskih širenja specifičnih klonova u europskim zemljama pa je tako opisana bolnička epidemija uzrokovana vrstom *Enterobacter aerogenes* s dokazanom TEM-24 β-laktamazom. TEM-52 također je novije otkrivena β-laktamaza koja se proširila po Europi s izolatima vrste *Salmonella*, ali danas se češće povezuje s izolatima *E. coli* iz mokraćnoga sustava (74). SHV porodica, s najčešće prisutnom SHV-12 inačicom, proširena je po cijelome svijetu kroz izolate *K. pneumoniae*, ali je u novijim studijama, kao i TEM-52, dokazujemo u izolatima *E. coli* izvanbolničkih pacijenata. Gen $bla_{\text{SHV-12}}$ povezan je s otpornošću na kinolone (*qnr*) i značajan je činitelj uspješnosti širenja takvih izolata. Gen $bla_{\text{SHV-12}}$ dokazan je i u izolatima s već prisutnim raznovrsnim bla_{ESBL} genima koji kodiraju TEM, GES ili CTX-M enzime, što je razlog za daljnja istraživanja takvih izolata (74).

Tijekom zadnjih petnaestak godina pojavnost i prevalencija CTX-M enzima u neprekidnome je rastu. U početcima širenja CTX-M izolati imali su ishodište u izvanbolničkoj populaciji

pacijenata s infekcijom mokraćnoga sustava. Smatra se da je povećanje broja ESBL izolata posljedica širenja specifičnih klonalnih grupa i epidemijskih plazmida u izvanbolničkoj sredini i zdravstvenim ustanovama (75, 76, 77). CTX-M tipovi ESBL enzima počinju se učestalo registrirati krajem 20. i početkom ovoga stoljeća u većini zapadnih zemalja osim SAD-a gdje su još uvijek dominirali SHV i TEM tipovi ESBL enzima. Tijekom sljedećih godina dolazi do nagloga širenja CTX-M enzima i u SAD-u te njihova učestalost u pojedinim regijama raste od 0 % u 2002. godini do 70 % u 2006. godini. Najčešće dokazana inačica CTX-M enzima u SAD-u je CTX-M-15, a prema učestalosti je prate CTX-M-16, CTX-M-8 i CTX-M-14 (78). Analiza pojavnosti pojedinih vrsta CTX-M enzima pokazuje grupiranje pojedinih tipova enzima u određenim zemljama, ali i grupiranje enzima ovisno o korisničkoj populaciji (bolnički i izvanbolnički). U Španjolskoj je rasprostranjena CTX-M-9 inačica dok je CTX-M-14 najčešće dokazana kod izvanbolničkih pacijenata u Portugalu, Francuskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu, a samo povremeno u drugim europskim zemljama (74). Iako su CTX-M-15 producirajući izolati početkom svjetskoga širenja uglavnom dokazani u izvanbolničkim izolatima, danas su vrlo česti na bolničkim odjelima. Uspješnost širenja CTX-M izolata povezana je ne samo s pripadnošću specifičnome klonu i filogenetskoj grupi već i sa sposobnošću prijenosa specifičnih plazmida koji sadržavaju $bla_{\text{CTX-M}}$ gene. Ta vrsta epidemijskoga plazmida dokazana je u izolatima iz brojnih europskih zemalja, poput Španjolske, Francuske, Portugala, Austrije, Ujedinjenog Kraljevstva i Hrvatske (74, 75, 76, 79). Osobitost je izolata koji izlučuju CTX-M enzime, a koja se koristi u inicijalnome razvrstavanju tipa lučitelja, 7 mm manja zona cefotaksima u odnosu na zone ceftazidima koja se uočava tijekom testiranja izolata disk-difuzijskom metodom (80). Povećanje CTX-M producirajućih izolata u izvanbolničkoj populaciji povezuje se između ostaloga i sa starenjem društva i posljedično većim brojem tercijarnih ustanova, poput staračkih domova i hospicija. Upravo takva mjesta postaju ishodište iz kojih se izolati navedenih karakteristika prelijevaju u bolničke prostore (77, 78). Studije provedene u prošlome desetljeću na području Hrvatske (2000. – 2010.) ukazale su na visoku prevalenciju SHV ESBL enzima u izolatima *E. coli* i *K. pneumoniae* (66, 79, 80). Budući da je na svjetskoj razini došlo do promjene učestalosti pojedinih tipova ESBL enzima s brzim širenjem i predominacijom CTX-M enzima, jedan je od ciljeva ovoga rada utvrditi je li na području Hrvatske također došlo do predominacije CTX-M β-laktamaza.

1.7. Epidemijski plazmidi

Plazmidi predstavljaju dvolančanu uzvojnicu izvankromosomske DNK koja se replicira neovisno o replikaciji kromosoma bakterijske stanice. Raznovrsnost je plazmidnoga genoma velika, a genski materijal unutar plazmida raspršen je na brojne pokretne elemente koji svojstva prenose unutar bakterijske stanice, između kromosoma i plazmida, ali i izvan nje tijekom transkonjugacije. U pokretne elemente spadaju IS (insercijske sekvencije), transpozomi i integroni. Plazmidi su podijeljeni u 23 inkompatibilne grupe (engl. *incompatibility plasmid group*, Inc) temeljem saznanja da se plazmidi s istim replikonom ne mogu stabilno razmnožavati u istoj stanici zbog nadmetanja za najčešće stanične funkcije uključene u kontrolu replikacije plazmida. Replikon je visoko konzervirani dio plazmida u kojemu su smješteni geni odgovorni za kodiranje početka diobe (replikacije), njezinu kontrolu i broj nastalih kopija. Utvrđivanje inkompatibilnih grupa danas se provodi metodom tipiziranja replikona koja omogućuje podjelu i unutar iste inkompatibilne grupe plazmida. Inkompatibilne plazmidne grupe, IncF, IncA/C, IncL/M, IncN i IncI smatraju se endemski prisutnima među članovima porodice enterobakterija. Unutar iste Inc grupe plazmida prisutne su brojne inačice. IncF plazmid prisutan u ESBL izolatima *E. coli* utvrđen je i u osjetljivim izolatima toga mikroorganizma i omogućuje brzu aktivaciju ESBL fenotipa pod utjecajem antimikrobnoga pritiska (35, 81, 82).

1.8. Čimbenici rizika za razvoj infekcije uzrokovane s ESBL producirajućim bakterijama

Prethodna primjena cefalosporina proširenoga spektra, aminoglikozida i fluorokinolona prepoznata je kao rizični čimbenik za nastanak infekcija uzrokovanih ESBL producirajućim izolatima. Prisutnost raznovrsnih genskih elemenata, nositelja svojstva višestruke antimikrobne otpornosti, ima značajnu ulogu u selekciji ESBL izolata. Tako su npr. $bla_{\text{CTX-M-2}}$ i $bla_{\text{CTX-M-9}}$ geni povezani s klasom 1 integrona nositelja ISCR1 sekvencije koja je istovremeno povezana s Tn*21* transpozonom, nositeljem rezistencije na živu (83). Integroni mogu nositi različite rezistentne *kazete* te u jednome integronu može biti prisutno više raznovrsnih osobitosti, poput rezistencije na aminoglikozide, trimetoprim ili sulfonamide i dezinficijense. Osim toga, opisana je povezanost bla_{ESBL} gena s genskim odrednicama koje kodiraju mehanizme otpornosti u samim početcima njihove aktivacije, i to uglavnom kod izolata koji luče CTX-M enzime. Genske determinante uključuju 16S RNA metilazu (*arm*A i *rtm*B gene povezane s CTX-M-3 i različite Qnr (engl. *Quinolone-resistance*) proteine (QnrA povezan s CTX-M-1, CTX-M-15 i CTX-M-9, QnrB povezane s CTX-M-15 i QnrS povezane s CTX-M-1 i CTX-M-9). Osim QnrB, koji pospješuje lučenje CTX-M-15 enzima, sličan utjecaj ima i fluorokinolon acetiltransferaza, aac(6')-Ib-cr (75, 76, 84). Iako su transpozoni i

insercijske sekvencije važni činitelji mobilizacije i širenja *bla*$_{ESBL}$ gena, plazmidi također igraju važnu ulogu u širenju navedenih gena i genskog materijala.

ESBL producirajući izolati uglavnom se javljaju u zdravstvenim ustanovama, poput bolnica s većom učestalošću u velikim kliničkim centrima s velikim brojem pacijenata. U takvim centrima dodatne pretrage i zahvate često obavljaju korisnici drugih zdravstvenih ustanova, poput manjih gradskih i županijskih bolnica, korisnici različitih specijalnih i tercijarnih ustanova kao i korisnici koji su već bili na dijagnostičkim i(li) terapijskim postupcima koji također predstavljaju rizik za stjecanje *bolničkih* infekcija. ESBL izolati učestaliji su u zdravstvenim ustanovama i na odjelima gdje se liječe politraumatizirani, imunokompromitirani i imunodeficijentni pacijenti koji uslijed brojnih osobnih rizičnih činitelja zahtijevaju primjenu različitih pomagala (mehanička ventilacija, urinarni kateteri, centralni venski pristup, braunile) i primjenu antimikrobne terapije te vrlo brzo postaju kolonizirani ESBL izolatima ili drugim otpornim mikroorganizmima iz bolničke sredine. Učestalost kolonizacije i(ili) infekcije ESBL izolatima češća je kod pacijenata u jedinicama intenzivnoga liječenja, kod pacijenata podvrgnutih kirurškim zahvatima, i to najčešće abdominalnim, kod pacijenata na mehaničkoj ventilaciji, pacijenata s kateterima (CVK, urinarni kateteri), dugoležećih pacijenata, pacijenata s teškim osnovnim bolestima, pacijenata na dugotrajnoj antimikrobnoj terapiji, novorođenčadi niske porođajne težina te pacijenata iz tercijarnih ustanova, poput hospicija i domova za starije i nemoćne. Selekcijska uloga antibiotika, osobito cefalosporina treće generacije, ali i ostalih β-laktama, ima značajnu ulogu u širenju ESBL izolata (70, 85, 86). Provedene studije pokazale su da rotacija pojedinih antibiotika dovodi do smanjenja pojavnosti ESBL izolata u bolničkim uvjetima (86, 87, 88). Ulogu u selekcioniranju ESBL izolata ima i primjena aminoglikozida i aminopenicilina, pogotovo na pedijatrijskim odjelima (85, 89). Domovi za starije i nemoćne, hospiciji i druge ustanove tercijarne zdravstvene skrbi važan su izvor ESBL producirajućih izolata, najčešće uslijed učestaloga i neracionalnoga propisivanja antibiotika toj populaciji. Primjena antibiotika dovodi do kolonizacije probavnoga sustava ESBL producirajućim klonovima i drugim vrstama rezistentnih patogena, poput vankomicin rezistentnog enterokoka, te takve osobe postaju izvor otpornih izolata za ostale korisnike zdravstvene ustanove. Nedovoljna higijena ruku u zdravstvenoj ustanovi, niski higijenski standardi dijagnostičkoga pribora, otopina i površina dovode do brzoga širenja takvih patogena zdravstvenom ustanovom (25). Dugotrajna kolonizacija probavnoga sustava predstavlja ishodište budućih izvanbolničkih infekcija ESBL producirajućim izolatima *E. coli*. Većina objavljenih studija povezanih s

navedenim problemom upućuje na kratko vrijeme proteklo između hospitalizacije i izolacije otpornih klonova. Međutim, čini se da kolonizacija probavnoga sustava može trajati više od godinu dana od trenutka stjecanja otpornoga klona do pojava izvanbolničke infekcije uzrokovane takvim mikroorganizmom (90).

Infekcije uzrokovane ESBL izolatima dovode do povećane potrošnje rezervnih, skupih antibiotika s neizvjesnim terapijskim ishodom. Vrsta ESBL enzima koja se javlja unutar određene zdravstvene ustanove ili na nekome zemljopisnome području najčešće je rezultat selekcijskoga pritiska antibiotika koji se učestalo koriste u empirijskoj terapiji različitih infektivnih stanja, zanemarivanja mogućnosti deeskalacije antimikrobne terapije temeljem dobivenih mikrobioloških rezultata, ali i uslijed olakoga propisivanja antibiotika izvanbolničkim pacijentima, najčešće zbog virusnih infekcija. Neracionalna primjena antibiotika u humanoj medicini, veterinarskoj medicini i značajna primjena u ekstenzivnoj proizvodnji hrane dovode do selekcijskoga pritiska na populacije mikroorganizama i olakšavaju kruženje epidemijskih plazmida, nositelja otpornosti na antibiotike. Na taj način otporni mikroorganizmi i njihovi genski elementi kruže između zdravstvenih ustanova, izvanbolničke populacije, životinja i okoliša (70, 84).

1.8.1. Terapija infekcija uzrokovanih sa ESBL producirajućim bakterijama

ESBL producirajući izolati uz otpornost na β-laktamske antibiotike, osim karbapenema, iskazuju otpornost i na aminoglikozide, kinolone i kotrimoksazol (25). Geni koji kodiraju produkciju β-laktamaza, kao i geni koji nose svojstvo otpornosti na aminoglikozide, često se nalaze na istome konjugativnome plazmidu te se zajednički prenose s jednoga mikroorganizma na drugi. Teorijski to znači da se otpornost na dva različita antibiotika može selekcionirati primjenom samo jednoga od njih (15). Tijekom rutinskih laboratorijskih testiranja ESBL producirajući izolati ponekad iskazuju osjetljivost na pojedine cefalosporine, ali se njihova terapijska primjena pokazala neuspješnom osim u slučajevima liječenja infekcija mokraćnoga sustava (5, 87, 88). Urinarne infekcije izvanbolničkih pacijenata uzrokovane ESBL producirajućim enterobakterijama, u prvome redu *E. coli*, predstavljaju značajan terapijski problem. Ukoliko se radi o ESBL producirajućim izolatima *E. coli* osjetljivim na kombinaciju amoksicilina i klavulanske kiseline, onda je to lijek izbora za takve infekcije. Međutim, kod ESBL izolata otpornih na kombinaciju amoksicilina i klavulanske kiseline u obzir dolaze cefalosporinski antibiotici 2. generacije iz skupine cefamicina (cefoksitin, moksalaktam) koji dobro djeluju na izolate koji luče TEM, SHV i CTX-M. Ti

cefalosporini mogu se, međutim, primijeniti samo u slučajevima kada uz neki od navedenih enzima ne postoji istovremeno svojstvo lučenja AmpC β-laktamaza ili gubitak porina vanjske membrane jer na takve izolate ne djeluju. Uslijed učestale pojave izolata koji luče obje vrste enzima cefamicini sve rjeđe dolaze u obzir kao terapijska opcija. Osim na navedene vrste izolata cefamicini ne djeluju ni na mutante s defektom u porinima. Sljedeća su terapijska opcija pojedini cefalosporini 3. generacije, poput cefdinira, po sastavu sličnoga cefiksimu. Cefdinir je cefalosporin širokoga spektra koji se može primjeniti u oralnome obliku, otporan je na hidrolitičko djelovanje najčešćih β-laktamaza, ima odličnu distribuciju u mokraćnome sustavu i postiže visoku koncentraciju u urinu. Primjena cefalosporina 4. generacije, poput cefepima, ima opravdanje kod ESBL izolata koji luče SHV ili TEM tip β-laktamaza. Međutim, kod infekcije CTX-M β-laktamaza lučiteljima cefepim nije terapijska opcija jer je podložan hidrolitičkom djelovanju tih enzima (88, 89, 90).

Obećavajuću djelotvornost prema ESBL izolatima iskazao je stari antibiotik fosfomicin koji prema pojedinim studijama djeluje na čak 91,3 % CTX-M producirajućih *E. coli* iz urina. Fosfomicin onemogućuje sintezu staničnoga zida bakterije, dobro se podnosi i može se dati u jednokratnoj, jednodnevnoj dozi. Odlična penetracija u urin, rijetka pojava otpornosti na njega te malo nuspojava, čine taj lijek terapijskom opcijom u liječenju izvanbolničkih, urinarnih infekcija (87, 88).

Primjena aminoglikozida u terapiji ESBL infekcija moguća je samo ukoliko je izolat na njih osjetljiv. ESBL izolati uglavnom su otporni na većinu aminoglikozida, osim amikacina, jer se na istom plazmidu uz gene koji kodiraju ESBL svojstvo nalaze i geni koji kodiraju otpornost na aminoglikozide (89, 91).

Uvođenje kinolona u antimikrobnu terapiju sredinom 80-ih godina prošloga stoljeća dovelo je do revolucije u terapiji urinarnih infekcija zbog uvjerenja da će razvoj otpornosti bakterija na te antibiotike biti neznatan. U sljedećih nekoliko godina nakon početka primjene otpornost je registrirana u niskim postocima. Nakon petnaestak godina primjene velik broj enterobakterija iskazuje otpornost na kinolonske antibiotike uslijed česte terapijske primjene u bolničkim i izvanbolničkim uvjetima. U početcima širenja ESBL izolata otpornost na kinolone bila je uglavnom kromosomskoga porijekla, no krajem prošloga stoljeća otkriveni su izolati s plazmidski reguliranom rezistencijom na kinolone. Plazmidni smještaj gena omogućio je ubrzano širenje svojstva otpornosti na kinolone čime se povećao broj takvih izolata u kliničkim uzorcima. Pojavnosti takvih izolata u zdravstvenim ustanovama značajno doprinosi

antimikrobni pritisak, boravak u JIL-u i prethodni boravak u tercijarnoj ustanovi. Mehanizmi otpornosti na kinolone mogu biti pojačani istovremenom prisutnošću aktivnoga efluksa antibiotika i(li) promjenama proteina vanjske membrane u kombinaciji s plazmidski kodiranim lučenjem ESBL enzima (92).

Karbepeni (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) prvi su antibiotici u terapijskome izboru za teške i(li) sistemske infekcije izazvane ESBL izolatima. Građa i veličine molekule omogućuju dobro prodiranje kroz vanjsku membranu enterobakterija (86, 93). Ertapenem pripada novijim karbapenemima (*1-ß-methyl carbapenem*) čija je primjena počela 2001. godine. Pokazuje visoku aktivnost prema ESBL i AmpC producirajućim izolatima iz porodice enterobakterija i ne potiče nastanak otpornosti na karbapeneme kod pseudomonasa. Rezistencija na karbapeneme kod ESBL izolata rijetka je i najčešće je posljedica istovremenoga lučenja ESBL enzima i karbapenemaza. Rijetki slučajevi rezistencije na ertapenem koji nisu posredovani karbapenemazama uglavnom su posljedica međudjelovanja produkcije ESBL enzima i promjenama u ekspresiji proteina vanjske membrane (engl. *outer membrane protein*, OMP), poput OMPK35 i OMPK36 (25, 93).

Infekcije uzrokovane ESBL izolatima značajan su terapijski i epidemiološki problem u bolničkim i izvanbolničkim uvjetima. U zdravstvenim ustanovama najčešće se javljaju epidemijski, terapijske su mogućnosti ograničene, često dolazi do komplikacija tijekom liječenja te su takvi pacijenti izloženi velikome riziku od smrtnoga ishoda. U slučajevima životno ugrožavajućih infekcija terapijski je izbor sužen i svodi se na upotrebu karbapenema koji se najčešće kombiniraju s aminoglikozidima, i to uglavnom s amikacinom jer su na gentamicin rezistentni. Takve kombinacije kod pacijenata na dijalizi i(li) s renalnom insuficijencijom mogu biti vrlo problematične i upitnoga uspjeha zbog potrebe prilagodbe doziranja. Upotreba karbapenema i(li) aminoglikozida u terapiji izvanbolničkih, najčešće urinarnih, infekcija izazvanih ESBL izolatima otežana je uslijed nemogućnosti oralne primjene tih antibiotika te se takva terapija provodi svakodnevnim dolaskom pacijenta u dnevnu bolnicu. Kod izvanbolničkih pacijenata ertapenem je tada lijek izbora zbog otpornosti na hidrolitičko djelovanje β-laktamaza, dugog poluvremena raspada, jednokratne aplikacije i postizanja visokih koncentracija u urinu (25, 91, 92). Novi antibiotici poput cefdinir-amoksicilin-klavulanata i ertapenema te stari antibiotici poput fosfomicina zasad su jedine dostupne terapijske mogućnosti za izvanbolničke pacijente s urinarnim infekcijama uzrokovanih ESBL producirajućom *E. coli* (87, 88).

U sredinama gdje je zbog povećnja broja ESBL infekcija povećana primjena karbapenemskih antibiotika dolazi do posljedičnoga povećanja otpornosti na karbapeneme kod vrsta iz porodice enterobakterija kao i kod vrsta *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* (*baumannii*), što dodatno smanjuje terapijske mogućnosti. Zbog dugotrajnosti postupka otkrivanja novih antibiotika i vremena koje protekne od njihova otkrića do trenutka kliničke primjene u takvim je situacijama izuzetno važna primjena različitih snopova postupaka u kontroli bolničkih infekcija. Nadzor i kontrola nad prevalencijom takvih izolata u bolnicama, strogo pridržavanje higijene ruku, ograničavanje primjene širokospektralnih penicilina, cefalosporina i općenito racionalna primjena antibiotika čine snop postupaka čijom se primjenom barem donekle mogu držati pod kontrolom epidemijska širenja otpornih mikroorganizama u zdravstvenim ustanovama.

Tablica 1.2. Preporuke za terapiju infekcija uzrokovanih ESBL producirajućim izolatima

Tip infekcije	Terapija prvoga izbora	Terapija drugoga izbora
Bakterijemija, sepsa, septički šok	Karbapenem (ertapenem, imipenem, meropenem, doripenem)	Piperacilin-tazobaktam (PTZ), cefepim, aminoglikozidi (AG), ciprofloksacin
Infekcije urinarnoga sustava	ß-laktam + inhibitor amoksicilin - klavulanska kiselina (AMC) piperacilin-tazobaktam (PTZ), ceftazidim-avibaktam (CAZ-AVI), kinoloni, karbapenem	ß-laktam + inhibitor + AG, cefepime (ne kod CTX-M* producirajućih izolata) Fosfomicin
Infekcije respiratornoga sustava	Karbapenem, cefepim, kinoloni	PTZ + AG, ampicilin-sulbaktam (SAM) + AG
Intraabdominalne infekcije	Karbapenem, PTZ, CAZ-AVI + metronidazol	PTZ + AG SAM + AG Fosfomicin
Meningitis	Karbapenem (meropenem)	

*CTX-M – cefotaksimaza producirajući izolati

1.9. Laboratorijska detekcija i identifikacija ESBL producirajućih izolata

Uobičajenim, rutinskim metodama testiranja osjetljivosti, poput disk-difuzije, ne može se utvrditi prisutnosti ß-laktamaza proširenoga spektra (ESBL). Stoga su u primjeni dodatni laboratorijski testovi za prepoznavanje kliničkih izolata koji luče te enzime. Preporučeni postupci za dokaz ESBL producirajućih enterobakterija u prvome se redu temelje na uočenoj neosjetljivosti na oksimino-cefalosporine nakon čega slijedi primjena dodatnih fenotipskih ili molekularnih (genotipskih) metoda. Razlučna prijelomna točka osjetljivosti (engl. *breakpoint*) > 1 mg/L preporučena je za cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim i cefpodoksim u skladu s

preporukama EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) i CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (94, 95). Fenotipske metode temelje se na sinergijskom učinku cefalosporina treće generacije i klavulanske kiseline. Klavulanska kiselina ponovo uspostavlja osjetljivost na cefalosporine uslijed inhibicije enzima (5).

1.9.1. Fenotipski testovi za otkrivanje prisutnosti β-laktamaza

Metoda dvostrukog diska (DDST)

Dvostruki disk-sinergijski test (DDST) najčešći je fenotipski test koji se koristi u rutinskome radu kliničkih mikrobioloških laboratorija. Na Petrijevu ploču (Ø 90 mm) s Mueller-Hinton agarom nanosi se ispitivani izolat te se nakon kratkoga sušenja na ploču postavljaju tri testna diska. U sredinu se postavlja disk s amoksicilin-klavulanskom kiselinom, a sa svake strane jedan od cefalosporina treće generacije (ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim). Diskovi se postavljaju tako da udaljenost od sredine jednoga diska do sredine drugoga diska iznosi 2 cm. Ukoliko izolat izlučuje ESBL enzime, dolazi do širenja inhibicijske zone cefalosporina prema disku s klavulanskom kiselinom (5, 96).

Metoda kombiniranih diskova po CLSI-u

Prekonoćna kultura testiranoga soja pripremljena je kao i za prethodnu metodu i zasijana na MH agar. Na ploču su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama s i bez dodatka klavulanske kiseline. Klavulanska kiselina nakapa se na površinu diska u koncentraciji od 10 000 μg/ml. Ploče se inkubiraju 18 – 24 sata na 35 – 37 °C. Inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču bez klavulanske kiseline dokazuje produkciju ESBL (96).

ESBL gradijentni test (E-test)

U testu se koriste nitrocelulozne trake natopljene antibiotikom, i to na jednome kraju neki od cefalosporina treće generacije, a na drugome kraju isti cefalosporin u kombinaciji s inhibitorom β-laktamaza (najčešće klavulanatom). Test se smatra pozitivnim ukoliko je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) cefalosporina s inhibitorom za više od 3 razrjeđenja manja od MIK-a samoga cefalosporina (97).

Modificirani Hodge-test

Test se koristi za dokaz izlučivanja inducibilnih (AmpC) β-laktamaza, a izolati koji se testiraju tom metodom prvo se probiru prema osjetljivosti na cefoksitinski disk (30μg), a zatim testiraju modificiranim Hodge-testom. Taj se test koristi i za dokaz karbapenemaza, ali se umjesto cefalosporinskoga diska koristi disk karbapenema (96, 98, 99).

1.9.2. Molekularni testovi za otkrivanje prisutnosti ESBL enzima

Razvojem tehnologije i posljedično molekularne dijagnostike razvijale su se i tehnike dokazivanja prisutnosti i utvrđivanja vrste *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena. U početku pojavljivanja takvih izolata u kliničkome radu nakon primjene probirnih, fenotipskih metoda za utvrđivanje vrste enzima uglavnom se koristila metoda određivanje izoelektrične točke izoelektričnim fokusiranjem (10). Razvoj molekularnih metoda bio je neophodan uslijed sve većega broja β-laktamaza koje su s vremenom učestale među kliničkim izolatima.

Oligotipizacija

Prva molekularna metoda za dokaz β-laktamaza gena, (engl. *olygotyping*), temelji se na primjeni oligonukleotidnih DNK početnica označenih radioizotopom ili biotinom, pri čemu se koriste specifični oligonukleotidni odsječci za TEM i SHV enzime. Metoda otkriva točkaste mutacije u hibridizacijskim uvjetima (100, 101).

PCR

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) metoda je sinteze nukleinskih kiselina *in vitro* kojom se specifični odsječak DNK uz pomoć enzima DNK polimeraze umnaža u velikome broju kopija. Ciljni, specifični dio genoma određuje se izborom specifičnih početnih oligonukleotida ili početnica (engl. *primers*) koje omeđuju budući umnoženi odsječak. Klasičnom PCR metodom može se umnožiti samo DNK. U slučaju potrebe umnažanja specifičnoga odsječka RNK potrebno je prvo prepisati postojeću RNK u komplementarnu DNK primjenom enzima reverzne transkriptaze. Nakon završene PCR reakcije slijedi dokazivanje dobivenih produkata i potvrda njihove značajnosti. Najjednostavniji je i najčešće primjenjivani postupak horizontalna elektroforeza u agaroznome gelu koja omogućuje razdvajanje odsječaka DNK prema veličini. Veličina produkata određuje se na temelju usporedbe njihove veličine s veličinom standardiziranih odsječaka (engl. *ladder*, marker za molekularnu masu) razdvojenih elektroforezom pod istim

uvjetima. Danas se uglavnom koristi *multiplex*-PCR metoda pomoću koje se ovisno o vrsti početnica primjenjenih u testu mogu istovremeno dokazivati *bla* geni, određivati plazmidi i insercijske sekvencije (10, 64, 102).

PCR-RFLP (engl. *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) metoda je pri kojoj se osnovna PCR metoda nadograđuje dodavanjem restrikcijskih endonukleaza te se tako dobiveni fragmenti odvajaju elektroforezom. Veličine fragmenta dobivene cijepanjem restrikcijskim enzimima ukazuju na točkaste mutacije unutar bla_{TEM}, bla_{SHV} ili $bla_{CTX\text{-}M}$ gena (65, 100, 101, 102).

PCR-SSCP (engl. *Single-Strand Conformational Polymorphism*) metoda je koja se koristi za karakterizaciju SHV ß-laktamaza. Tom metodom detektiraju se pojedine mutacije na specifičnim mjestima unutar bla_{SHV} gena. Koriste se oligonukleotiden početnice i restrikcijski enzim (Pst1), a dobiveni se dijelovi denaturiraju i odvajaju u 20 % poliakrilamidnome gelu. Tom metodom dokazuju se geni koji kodiraju SHV ß-laktamaze -1,-2,-3,-4,-5 i -7 (101).

MLST

MLST (engl. *Multilocus Sequence Typing*) jedinstvena je, nedvojbena molekularna metoda za tipiziranje višestrukih lokusa (gena i genskih markera). To je postupak za karakterizaciju bakterijskih vrsta pomoću specifičnih unutarnjih DNK odsječaka višestrukih konstitutivnih gena (engl. *housekeeping genes*) potrebnih za održavanje osnovnih staničnih funkcija. Tijekom testiranja koriste se odsječci veličine 450 – 500 baznih parova (bp) budući da se oni mogu obostrano sekvencionirati u automatiziranim sustavima. Za svaki konstitutivni gen različiti odsječci prisutni unutar bakterijske vrste definirani su kao različiti aleli koji u svakome od sedam konstitutivnih lokusa određuju alelni profil ili slijedni tip (ST) za svaki izolat. Svaki izolat unutar iste bakterijske vrste nedvojbeno je karakteriziran nizom od sedam cijelih brojeva koji odgovaraju alelima u sedam konstitutivnih gena.

MLST se temelji na dobro utemeljenim metodama enzimske elektroforeze, ali se razlikuje po tome što se označeni aleli dokazuju direktnim sekvencioniranjem DNK najčešće PCR metodom, a ne neizravno, elektoforezom genskih produkata. Velika je prednost MLST metode nedvosmislenost podataka, a dobiveni profili mogu se usporediti s podatcima središnje baze podataka na mreži (*mist.net*, Imperial College, London i *pubmist.org*, Oxford University, Oxford, UK). Baze su podataka različite i sadrže referentne alele i popis slijednih tipova za pojedine organizme.Takav način usporedbe predstavlja značajan napredak u odnosu

na većinu tipizacijskih postupaka koji uključuju usporedbu veličine fragmenata DNK na gelovima. Klinička je primjena obećavajuća jer se alelni profili mogu dobiti direktno iz kliničkih uzoraka poput likvora ili krvi amplifikacijom sedam konstitutivnih gena. Tim načinom može se dokazati prisutnost određenih patogena i u situacijama kada ih ne možemo uzgojiti iz kliničkoga materijala (103).

2. HIPOTEZA RADA

Pretpostavka je da će CTX-M β-laktamaze biti prisutne i među bolničkim i izvanbolničkim izolatima *E. coli*. Također smatramo da će obrađeni izolati biti klonski srodni ako potječu iz istoga centra i s istoga zemljopisnoga područja dok će izolati iz različitih centara i iz različitih zemljopisnih područja imati različite PFGE profile, ali iste inkompatibilne grupe plazmida. Smatramo da je došlo do globalnoga širenja $bla_{\text{CTX-M}}$ gena i predominacije CTX-M tipa ESBL enzima u *E. coli* te da, zahvaljujući tome, više ne postoji jasna granica između bolničkih i izvanbolničkih izolata ESBL producirajuće *E. coli*.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJ

Opći je cilj istraživanja utvrditi postoje li razlike u genotipovima, fenotipu rezistencije i mehanizmima rezistencije između bolničkih i izvanbolničkih izolata ESBL producirajuće *E. coli* te postoje li navedene razlike između izolata ovisno o zemljopisnome podrijetlu.

CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi su istraživanja:

Raščlaniti evoluciju i razvoj otpornosti posredovane β-laktamazama proširenoga spektra i promjene u odnosu na prve β-laktamaze, članove SHV porodice.

Utvrditi na koji je način došlo do skretanja od SHV-2 i SHV-5 β-laktamaza iz ranih devedesetih godina do predominantno CTX-M tipova danas i kakva je uloga insercijskih sekvencija IS*26* i IS*Ecp* u mobilizaciji $bla_{\text{CTX-M}}$ gena.

Utvrditi proširenost CTX-M β-laktamaza među izolatima *E. coli* dobivenih od bolničkih i izvanbolničkih pacijenata.

Odrediti je li širenje β-laktamaza proširenoga spektra među izolatima *E. coli* posljedica vertikalnoga širenja srodnih izolata ili je u pitanju horizontalni prijenos plazmida između izolata konjugacijom.

SPECIFIČNI CILJEVI

Specifični su ciljevi istraživanja:

Ispitati osjetljivost ESBL producirajućih izolata *E. coli* na antibiotike

Odrediti fenotip rezistencije izolata

Genotipizirati izolate

Odrediti gene koji kodiraju ESBL

Odrediti inkompatibilne grupe plazmida koji kodiraju ESBL

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija predstavlja temeljno, fundamentalno, *in vitro* presječno istraživanje.

4.2. Bakterijski izolati

Izolati *E. coli* smanjene osjetljivosti na cefalosporine širokoga spektra (ESC) prospektivno su prikupljeni iz raznovrsnih kliničkih uzoraka bolničkih i izvanbolničkih pacijenata s područja Brodsko-posavske i Vukovarsko-srijemske županije u periodu od 1. siječnja 2016. do 31. prosinca 2016. godine. Podatci o distribuciji izolata prema ishodištu (bolnički/izvanbolnički), prema bolničkome odjelu, dobnim skupinama, spolu pacijenata i vrsti biološkoga uzorka dobiveni su iz osnovne medicinske dokumentacije Službe za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, Opće bolnice *Dr. Josip Benčević* i Službe za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Vukovarsko-srijemske županije. Istovrsni izolati dobiveni od istoga pacijenta nisu se koristili u istraživanju; izolati su skupljani na principu *jedan pacijent – jedan izolat*. Izolati su identificirani konvencionalnim biokemijskim testovima (fermantacija glukoze i laktoze s ili bez proizvodnje plina, bez stvaranja H_2S, stvaranje indola, neaktivnost ureaze i sposobnost dekarboksilacije lizina), potvrđeni automatiziranim sustavom VITEK 2 uporabom gram-negativne kolorimetrijske kartice (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska) i pohranjeni u mikrobank mediju na -70 °C do trenutka testiranja. Od ukupno 102 izolata ESBL producirajuće *E. coli* prikupljena za potrebe studije 70 izolata potječe od bolničkih pacijenata a 32 izolata potječu od izvanbolničkih pacijenata. Izolati su upotrijebljeni za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike i molekularna istraživanja.

4.3. Testiranje osjetljivosti na antibiotike

Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je disk-difuzijskom metodom i mikrodilucijom u bujonu. Za kontrolu kvalitete testiranja korišteni su standardizirani sojevi, *E. coli* ATCC 25922 (ESBL negativan soj) i *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL pozitivan soj) (94, 95).

4.3.1. Disk-difuzijska metoda

Izolati su testirani disk-difuzijskom metodom Kirby-Bauer na Mueller-Hinton (M-H) agaru s bakterijskim inokulumom gustoće 0,5 MacFarlanda (McF, 10^8/mL). Postupak se temelji na difuziji antibiotika impregniranih na papirnatim diskovima u određenoj koncentraciji kroz agarozni gel. Promjeri zona oko diska bez porasta mikroorganizma uspoređuju se sa standardiziranim zonama prema laboratorijskim protokolima. Dobiveni rezultat određuje testirani izolat kao osjetljiv (S, engl. *susceptible*), kao izolat smanjene osjetljivosti (I, engl. *intermediate*) ili otporan, tj. rezistentan (R, engl. *resistant*) (94,95). Izolati *E. coli* testirani su na sljedeće antibiotike (proizvođač Mast Diagnostica, Njemačka): ampicilin (10 μg), amoksicilin/ klavulanat (20 + 10 μg), cefaleksin (30 μg), cefoksitin (30 μg), cefuroksim (30 μg), cefotaksim (30 μg), ceftriakson (30 μg), ceftazidim (30 μg), cefepim (30 μg), gentamicin (10 μg), amikacin (30 μg), ciprofloksacin (5 μg), kotrimoksazol (1,25/23,75 μg), meropenem (10 μg), imipenem (10 μg) i ertapenem (10 μg). Rezltati su interpretirani prema EUCAST kriterijima (94).

Testiranje se izvodi nanošenjem suspenzije testiranoga izolata gustoće 0,5 McF pomoću vatenoga štapića na površinu M-H agara na koji se zatim nanose diskovi s antibioticima pomoću dispenzora ili pincete. Suspenziju izolata pripremamo uzimanjem 3 – 4 porasle kolonije s površine krute hranjive podloge koje razmutimo u fiziološkoj otopini (5 mL), homogeniziramo uz pomoć rotirajuće mućkalice uz provjeru dobivene gustoće soja (0,5 McF) denzitometrom (Densimat, bioMerieux, Francuska). Suspenziju nanosimo u trima smjerovima na površinu M-H agara te nakon kratkoga sušenja, unutar 15 minuta, postavljamo diskove s antibioticima. Antibiotik iz diska difundira kroz agarozu i stvara određeni gradijent koncentracije ovisno o udaljenosti od ruba diska. Područje oko diska gdje ne dolazi do porasta mikroorganizma naziva se zona inhibicije rasta. Nakon inkubacije na 35 ºC – 37 ºC/20 – 24 h mjerimo promjer inhibicijske zone ravnalom i izražavamo ga u mm. Na temelju izmjerenoga promjera inhibicijske zone određuje se je li ispitivani soj osjetljiv, smanjene osjetljivosti ili je otporan (rezistentan). Takav način testiranja osjetljivosti bakterija na antibiotike provodi se prema standardnim operativnim postupcima (SOP) rada u mikrobiološkim laboratorijima, a rezultati se interpretiraju prema prihvaćenim kriterijima. Na području Hrvatske u primjeni je metodologija izrade antibiograma i interpretiranje osjetljivosti prema EUCAST-u (*European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing*, EU) kriterijima. Interpretacija prema CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, SAD) kriterijima u uporabi je za pojedine

bakterijske izolate i(li) antibiotike koji još nisu definirani EUCAST-ovim smjernicama (94, 95).

4.3.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) najniža je koncentracija antibiotika koja onemogućuje umnožavanje testiranoga izolata ili laboratorijskoga soja. Može se određivati metodom dilucije u bujonu ili agar-dilucijskim testom.

Najčešći su razlozi za izvođenje metoda u svrhu određivanja MIK-a:

- testiranje sporo rastućih, metabolički zahtjevnih bakterija i anaerobnih bakterija
- potreba za određivanjem točne djelotvorne koncentracije antibiotika (najčešće se provodi za antibiotike veće toksičnosti i(li) male terapijske širine)
- određivanje osjetljivosti kod nepouzdanih ili nejasnih rezultata dobivenih disk-difuzijskom metodom (npr. osjetljivost *Streptococcus pneumoniae* na penicilin) ili radi utvrđivanja rezistencije niskoga stupnja (npr. prisutnost OXA-48 enzima)

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) studijskih izolata određene su mikro-dilucijskom metodom s dvostrukim razrjeđenjem antibiotika (od 0,008 do 1024 μg/ml) u M-H bujonu i mikrotitarskim pločicama s 96 jažica na sljedeće antibiotike: cefuroksim (Pliva, Zagreb), ceftazidim (Pliva, Zagreb), ceftriakson (Hoffman-La Roche AG), cefotaksim (Aventis), cefoksitin (Pliva, Zagreb), cefepim (Bristol-Myers Squibb), piperacilin-tazobaktam (Wyeth Laboratories), gentamicin (Pliva, Zagreb), amikacin (Pliva, Zagreb), imipenem (Merck, Sharp&Dohme), meropenem (Astra Zeneca) i ciprofloksacin (Bristol-Myers Squibb), a rezultati su interpretirani prema EUCAST prijelomnim točkama objavljenim 2017. godine. Prijelomne točke određene su prema vrsti antibiotika, prema koncentraciji koju taj antibiotik postiže u serumu, prema vrsti testiranoga mikroorganizma te prema težini i mjestu infekcije (94). Početne otopine antibiotika pripremljene su u sterilnoj, destiliranoj vodi u koncentraciji od 5120 mg/L i zatim razrijeđene u omjeru 1 : 10. Dvostruka serijska razrjeđenja pripremljena su u M-H bujonu te ukapana mikropipetom u jažice mikrotitarskih pločica u količini od 50 μL po jažici. Bakterijski inokulum gustoće 0,5 McF dodan je u količini od 50 μL. Mikrotitarske pločice inkubirane su 18 – 20 sati na 35 ºC – 37 ºC te je nakon inkubacije MIK očitan uz pomoć ogledala. MIK predstavlja najniža koncentracija antibiotika koja inhibira porast i umnožavanje testiranoga izolata.

4.4. Fenotipska detekcija β-laktamaza

Fenotipski testovi za utvrđivanje prisutnosti ESBL enzima temelje se na sinergizmu između cefalosporina proširenoga spektra (engl. *extended spectrum cephalosporins*, ESC) i kombinacije amoksicilina i klavulanske kiseline. Tom metodom ne možemo otkriti izolate koji produciraju AmpC ß-laktamaze proširenoga spektra jer ih klavulanska kiselina ne inhibira (46, 95).

Metoda dvostrukoga diska

U svrhu dokaza prisutnosti ESBL enzima primijenjen je dvostruki disk-sinergijski test (engl. *double disk synergy test*; DDST) (96). Prekonoćna kultura testiranoga izolata gustoće 0,5 McF nanosi se na M-H agar te se nakon kratkoga sušenja, unutar 15 minuta, postavljaju diskovi ceftazidima, amoksicilin-klavulanske kiseline i ceftriaksona (ili cefotaksima) na udaljenosti od 20 do 30 mm od centra do centra diska. Ploče se inkubiraju 18 – 24 h/35 ºC – 37 °C. Sinergija se ispoljava deformacijom inhibicijske zone rasta oko cefalosporina u smjeru centralnoga diska s klavulanskom kiselinom, što potvrđuje produkciju ESBL. Prednost je testa jednostavnost izvođenja, a nedostatak subjektivnost u očitavanju rezultata. Neki autori preporučuju upotrebu cefpodoksimskoga diska jer uspješno otkriva produkciju ESBL iz svih triju porodica (TEM, SHV i CTX-M). Ukoliko navedeni disk nije dostupan, za potvrdu prisutnosti CTX-M porodice enzima može se koristiti cefotaksim, a za TEM i SHV porodice ceftazidim (96).

Za kontrolu kvalitete testiranja korišteni su standardizirani sojevi, *E. coli* ATCC 25922 (ESBL negativan soj) i *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL pozitivan soj) (94, 95).

Gradijentni ESBL test (E-test)

Potvrdni test za dokaz izlučivanja ESBL u studijskih izolata proveden je ESBL-E-testom (ESBL E-test, BioMerieux, Francuska). Standardne E-test trake sadrže dva u suprotnim smjerovima nanesena i graduirana antibiotika. Na jednoj polovici trake nanesen je ceftazidim s rasponom MIK-a od 0,5 do 32 mg/ml, a na drugoj polovici trake kombinacija ceftazidima (s rasponom MIK-a od 0,125 do 8 mg/ml) i klavulanske kiseline u trajnoj koncentraciji od 4 mg/ml. Omjeri MIK-a ceftazidim/ceftazidim-klavulanat razlikovni su kriterij te je rezultat pozitivan ako je MIK ceftazidima s klavulanatom za najmanje 3 razrjeđenja manji od MIK-a samoga ceftazidima. Primjena testova s različitim cefalosporinima i njihovim kombinacijama s klavulanatom olakšava otkrivanje raznovrsnih ESBL enzima u izolatima (97).

Metode za detekciju AmpC β-laktamaza

Probirni test za dokaz prisutnosti AmpC β-laktamaza proveden je s cefoksitinskim diskom (30 μg). Izostanak ili smanjenje inhibicijske zone oko cefoksitinskog diska (< 18 mm) ukazivao je na moguću produkciju AmpC β-laktamaza. Kao potvrdna metoda za cefoksitin rezistentne izolate, primijenio se modificirani Hodge test (MHT). U testu je korišten indikator organizam, dobro osjetljiva *E. coli* ATCC 25922. Suspenzija standardiziranoga ATCC soja gustoće 0,5 McF nanese se na površinu M-H agara ili McConkey agara. Nakon kratkoga sušenja nanesene suspenzije studijski se izolat ezom nasadi ravnim potezom, dijametralno od jednoga do drugoga kraja ploče. U sredinu ploče, na povučenu liniju ispitivanoga izolata postavlja se disk cefoksitina (30 μg) i inkubira 18 – 24 h/35 ºC – 37 °C. Prisutnost deformirane zone inhibicije rasta oblika poput *lista djeteline* interpretira se kao pozitivan rezultat i upućuje na prisutnost cefotaksimaza ili srodnih cefalosporinaza (96, 99).

CIM TEST, prilagođena i izvorna metoda

Fenotipski test za dokaz aktivnosti karbapenemaza (engl. *Carbapenem Inactivation Method – CIM test*) prilagođen je za dokazivanje prisutnosti hidrolizirajućih β-laktamaza (104). Za potrebe studije u svrhu isključivanja prisutnosti drugih mehanizama inaktivacije β-laktamskih antibiotika (porini, efluks pumpa, promjena ciljnog mjesta) korišten je disk cefotaksima umjesto diska meropenema koji se koristi u izvornoj metodi. U suspenzije studijskih izolata gustoće 0,5 McF ubacuju se diskovi cefotaksima (30 μg) i inkubiraju u termostatu na 35 ºC – 37 °C tijekom 2 sata. Na M-H agar nanosi se suspenzija gustoće 0,5 McF *E. coli* ATCC 25922 na koju se postavljaju diskovi prethodno inkubiranoga i hidrolizi podvrgnutoga cefotaksima. Nakon inkubacije od 24 h/35 ºC – 37 °C promatrala se prisutnost ili odsutnost zone inhibicije oko diskova cefotaksima. Izostanak zone inhibicije oko diska dokaz je hidrolitičke aktivnost izolata. Izvorna CIM metoda primjenjuje se za dokaz prisutnosti karbapenemaza gram-negativnih izolata, ali umjesto diska cefotaksima koristi se disk meropenema (10 μg) i(li) ertapenema (10 μg) prema prethodno navedenome protokolu (104).

Modificirani Hodge test (MHT) za dokaz karbapenemaza

Standardizirani soj *E. coli* ATCC25922 suspenzije gustoće 0,5 McF nanese se na površinu M-H ili McConkey agara, a studijski se izolat ezom nasadi ravnim potezom, dijametralno od jednoga do drugoga kraja ploče. U sredinu ploče, na povučenu liniju ispitivanoga izolata stavlja se disk imipenema ili ertapenema od 10 μg te se inkubira na 24 h/35 ºC – 37 °C.

Prisutnost deformirane zone inhibicije rasta poput *lista djeteline* oko karbapenemskoga diska interpretira se kao pozitivan rezultat i upućuje na prisutnost karbapenemaza (96, 99).

4.5. Testiranje prijenosa rezistencije konjugacijom

U postupku istraživanja otpornosti nekoga izolata prvi je korak pokušaj prijenosa odrednice (determinante) otpornosti (rezistencije) na dobro definiranu vrstu primatelja. Izolati dobiveni iz kliničkih uzoraka pacijenata obično sadrže višestruke plazmide, što otežava određivanje smještaja odrednice otpornosti. Prijenos otpornosti na laboratorijski definirani, primateljski soj omogućuje utvrđivanje prisutnosti specifičnih plazmida koji često nose odrednice otpornosti. Prijenos plazmida u poznatu gensku osnovu, omogućuje procjenu cjelokupnoga kompleta odrednica koje nosi plazmid (105). Prijenos plazmida unutar bakterijske populacije može biti vertikalan i horizontalan. Plazmidi mogu biti specifični samo za određene bakterijske vrste dok se drugi mogu prenijeti na velik broj vrsta. Pojedini plazmidi imaju sposobnost samostalnoga prijenosa (konjugacije) između davatelja (donora, tj. plazmid-pozitivnoga izolata) i primatelja (recipijenta, tj. plazmid-negativnoga izolata ili kontrolnoga, laboratorijskoga soja). Plazmidi sa sposobnošću samostalnoga prijenosa sadrže F-pile ili konjugativne plazmide, no takvo svojstvo nemaju svi plazmidi. Plazmidi bez F-pila mogu se prenijeti samo istovremeno s konjugativnim plazmidima. Pojedini plazmidi mogu se integrirati u bakterijski kromosom i ukoliko imaju svojstvo konjugacije, sposobni su prenijeti velike dijelove kromosomskoga materijala u primaoca. Plazmidima se prenose raznovrsna svojstva bakterija poput virulencije i otpornosti na antimikrobne lijekove. Konjugativni R-plazmidi obično prenose svojstvo otpornosti na više vrsta antibiotika, što bakterijskim nositeljima takvih plazmida daje značajnu sposobnost prilagodbe na uvjete pojačanoga antimikrobnoga pritiska (105, 106).

Prijenos rezistencije dokazan je metodom konjugacije u moždano-srčanome infuzijskome bujonu (engl. *brain heart infusion broth*, BHI). Primatelj je laktoza-negativan soj *E. coli* A 15 R- slobodan od plazmida i otporan na natrijev azid. Prekonoćne BHI kulture kliničkih izolata *E. coli* donora i laboratorijskoga soja *E. coli* primatelja pomiješale su se u omjeru 1 : 2 u 5 ml BHI bujona i inkubirale 18 h/35 °C bez dodatnoga miješanja. Dobiveni transkonjugant razrijedio se fiziološkom otopinom u omjeru 1 : 100 i 1 : 1000 te u količini od 100 µL nasadio na McConkey podlogu s cefotaksimom koncentracije 2 mg/L. Istovremeno se na podlogu s natrijevim azidom nasadila nerazrijeđena prekonoćna kultura davatelja. Soj primatelj (*E. coli* slobodna od plazmida) u razrjeđenju 1 : 100 i 1 : 1000 nasadila se na hranjivu podlogu s

dodatkom natrijeva azida dok se nerazrijeđena kultura istoga soja nasadila na podloge s cefotaksimom. Kao kontrola su služile iste suspenzije soja davatelja i soja primatelja koje su nasađene na podloge s cefotaksimom i natrijevim azidom.

Očekivani je rezultat porast izolata davatelja (donora) na podlogama s cefotaksimom, ali ne i na podlogama s natrijevim azidom dok soj primatelj (recipijent) treba porasti na podlogama s natrijevim azidom, ali ne i na podlogama s cefotaksimom. Selekcija transkonjuganata očituje se kao porast laktoza pozitivnih kolonija na pločama s dodanom kombinacijom cefotaksima i natrijeva azida budući da su kolonije primatelja negativne. Frekvencija konjugacije određena je u odnosu na broj poraslih kolonija davatelja. Uspješnost prijenosa otpornosti na antibiotike poput gentamicina, tetraciklina, sulotrima, ciprofloksacina i kloramfenikola dokazana je antimikrobnim testiranjem poraslih transkonjuganata. Uspješnost prijenosa plazmida provjerila se usporedbom MIK-ova davatelja i MIK-ova poraslih transkonjuganti za β-laktamske antibiotike te disk-difuzijskom metodom za ne-β-laktame. Ukoliko dođe do prijenosa plazmida koji kodiraju lučenje ESBL enzima na transkonjugante, transkonjugati i davatelji imaju sličan fenotip otpornosti (108, 109). Prijenos *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena na transkonjugante, potvrđen je PCR metodom (64, 65).

Izolati s MIK-om ertapenema od 1,0 mg/L dodatno su testirani istom metodom na podlogama s meropenemom u koncentraciji od 0,12 mg/L u svrhu dokazivanja prijenosa otpornosti na karbapeneme. Prijenos *bla*$_{\text{CARBA}}$ gena na transkonjugante potvrđen je PCR metodom (70).

4.6. Genotipizacija izolata

Genotipizacija izolata provedena je ekstrakcijom kromosomske DNK i elektroforezom u pulsirajućemu polju (PFGE) (58, 59). Tipizacijom multilokusnih sekvenci (engl. *Multilocus Sequence Typing*, MLST) određena je pripadnost ST klonovima (103).

4.6.1. Elektoforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

U svrhu genotipizacije (utvrđivanja klonske pripadnosti) izolata koji pripadaju različitim rezistotipovima određivao se makrorestrikcijski profil ukupne DNK metodom elektroforeze u pulsirajućemu polju (engl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) (58, 59). Metoda se najčešće koristi za utvrđivanje epidemiološke povezanosti između izolata dobivenih od pacijenata unutar zdravstvene ustanove, tijekom epidemijskih događanja i za potrebe dokazivanja klonske povezanosti bolničkih i izvanbolničkih izolata.

Liziranje bakterijskih stanica

Studijski izolati nasađeni su na hranjive krvne podloge i inkubirani prekonoćno. Od poraslih kolonija napravljena je suspenzija u 5 ml BHI bujona. Suspenzija je inkubirana prekonoćno uz neprekidno miješanje u *swing* inkubacijskoj kupelji na temperaturi od 37°C do kasne logaritamske faze, tj. gustoće suspenzije od 4 McF. Nakon inkubacije 1 ml dobivene suspenzije centrifugirao se na 10000 okretaja tijekom 2 minute. Nakon centrifugiranja i taloženja stanice su resuspendirane u 300 µl pufera EC. Dodano je 10 µl otopine lizozima i 300 µl 1,7 % agaroze LGP zagrijane na 55 °C te je sve kratko i dobro izmiješano. Po 100 µl dobivene stanično-agarozne suspenzije otpipetirano je u kalupe za formiranje blokova agaroze te ostavljeno 10 minuta na sobnoj temperaturi. Blokovi agaroze preneseni su u 2 ml pufera EC i inkubirani 1 sat na 37°C. Pufer EC uklonjen je, a blokovi agaroze preneseni su u 300 µl pufera ESP (0,5M EDTA, pH 9,6; 1 % natrijev laurilsarkozin; 1 mg proteinaze K/ml) te inkubirani 2 sata na 55 °C. Nakon toga blokovi agaroze inkubirani su u 2 ml PMSF-a (1mM phenilmethilsulfonilfluorid u TE puferu, pH 8,0) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon završetka inkubacije blokovi su agaroze isprani u 5 ml pufera TE. Ispiranje se provodi u pet ciklusa po 30 minuta na + 4 °C.

Cijepanje kromosomske DNK pomoću restrikcijskih endonukleaza X*ba*I

Blokovi agaroze s uklopljenom kromosomskom DNK prvo su isprani u 5 ml destilirane vode, dvaput u trajanju 30 minuta na temperaturi + 4 °C. Nakon toga uravnoteženi su u po 3 ml odgovarajućega pufera za restrikciju uz inkubaciju 2 x 30 minuta na sobnoj temperaturi. DNK u jednome bloku agaroze pocijepana je s *Xba*I endonukleazom (Sigma, SAD). 200 µl smjese za cijepanje sadrži 2 µl enzima, 20 µl odgovarajućega pufera za restrikcijski enzim i 178 µl vode. Blok agaroze inkubiran je sa smjesom za cijepanje na temperaturi koju je propisao proizvođač za odgovarajući enzim uz vrlo lagano miješanje od 15 o/min. Završetkom enzimske digestije blok agaroze prenesen je u 2 ml prethodno na + 4 °C ohlađenog TE pufera.

Elektroforeza odsječaka DNK u pulsirajućemu električnome polju

Pripremljeno je 150 ml 1 %-tnog gela agaroze (PFGE agaroza) u puferu 0,5 x TBE. U jažice gela smješteni su blokovi agaroze koji sadrže molekularni standard lambda (λ) konkatamer. Blokovi su zapečaćeni s 0,6 % agarozom zagrijanom na 50 °C. U prethodno na 10 °C ohlađen pufer 0,5 x TBE dodana je tiourea (50 µM). Gel s nanesenim i zapečaćenim blokovima agaroze postavljen je u 0,5 x TBE pufer za razdvajanje i uravnotežen na sobnoj temperaturi

prije početka elektroforeze. U svakome gelu kao molekularni standard korišten je lambda konkatamer. Pufer je korišten jednokratno. Trajanje je elektroforeze za *E. coli* 22 sata, početno vrijeme pulsiranja 5 sekundi, završno vrijeme pulsiranja 50 sekundi, jakost polja 6 V/cm, a kut pulsiranja 120° pri temperaturi od 14 ºC.

Dokumentiranje i interpretiranje rezultata

Po završetku elektroforeze gel je obojen standardiziranom otopinom etidijevoga bromida od 1 µg/ml tijekom 30 minuta te je odbojen u destiliranoj vodi. Gel je fotografiran uz osvjetljenje na UV transluminatoru s UV svjetlom valne dužine 256 nm. Dobivene fotografije pohranjene su za kasniju računalnu analizu programom *GelComparII* (Applied Maths, Ghent, Belgija). Računalni program izračunava koeficijent sličnosti između testiranih izolata koji se prikazuju u dendogramima. *GelCompar* program sličnost svakoga para izolata prikazuje dendogramom koji se bazira na Diceovu koeficijentu sličnosti uz 3 %-tnu toleranciju vrpci i uz parametar optimizacije od 0,5 %. Izolati kod kojih postoji sličnost od najmanje 80 % prikazanih vrpci smatraju se klonski povezanim izolatima jer upravo ta vrijednost korelira s razlikom u broju i položaju vrpci od mjesta 1 do mjesta 6.

Kriteriji za interpretaciju

Kriterije za interpretaciju rezultata opisao je Tenover prema kojemu je potrebno prikazati najmanje deset vidljivih vrpci dobivenih djelovanjem restrikcijskog enzima (59).

Kod istovjetnih izolata nema razlike u broju i položaju vrpci i za njih se smatra da su genski identični i epidemiološki povezani.

Vrlo slični izolati imaju razliku u 2 – 3 vrpce te nastaju uslijed slučajne genske promjene, poput točkastih mutacija na mjestu restrikcije ili uslijed insercija i(li) delecija genskoga materijala. Genske promjene povezane s delecijama ili insercijama mijenjaju veličine fragmenata te se izolati razlikuju u najviše dvije vrpce. Ukoliko se promjena u genomu događa na mjestu restrikcije, insercijski događaj dijeli fragment u dva dijela i pritom stvara razliku profila u 3 vrpce. Pojava delecije na mjestu restrikcije spaja dva susjedna fragmenta te se i u tome slučaju PFGE profil razlikuje u trima vrpcama. Relokacija restrikcijskoga fragmenta rezultira povećanjem jednoga i smanjenjem drugoga fragmenta te je konačni ishod razlika u četirima vrpcama. Razlika u četirima vrpcama najčešće je posljedica dvaju neovisnih genskih događaja iako ponekad može biti posljedica i samo jedne promjene u genskoj strukturi.

Srodni izolati razlikuju se u 4 – 6 vrpci. Obično se radi o dvama neovisnim događajima, poput delecije, insercije i(li) gubitka restrikcijskoga mjesta. Takvi izolati mogu biti podrijetlom od istovjetnoga izvora, ali najčešće nisu epidemiološki povezani. Takve razlike među izolatima uočavamo tijekom prikupljanja kroz duži period, obično više od šest mjeseci.

Različiti, nesrodni izolati imaju razlike u sedam i više vrpci u PFGE profilu.

4.6.2. MLST (engl. *Multilocus Sequence Typing*)

Tipizacija reprezentativnih izolata u svrhu određivanja pripadnosti ST klonu provedena je MLST metodom prema protokolima dostupnim na Pasteurovoj mrežnoj stranici (http://bigsdb.pasteur.fr/ecoli/ecoli.html) (67, 103).

4.7. Molekularna karakterizacija β-laktamaza proširenoga spektra (*bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{CTX-M}}$, *bla*$_{\text{OXA-48}}$)

Prisutnost *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena (*bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{CTX-M}}$) i prisutnost *bla*$_{\text{CARBA}}$ gena (*bla*$_{\text{OXA-48}}$) dokazana je multipleks PCR metodom primjenom početnica za navedene gene (64, 65, 70). Početnice su nabavljene iz Genbank (Genbank, National Center for Biotechnology, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Vrsta insercijskih sekvencija u izolatima dokazana je metodom PCR mapiranja s *forward* početnicom za insercijsku sekvenciju i *revers* početnicom za *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gen te obrnuto s *forward* početnicom za *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gen i *revers* početnicom za insercijsku sekvenciju. Tim načinom mapiranja možemo utvrditi je li insercijska sekvenca ispred ili iza *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena. Istim protokolom, ali s različitim početnicama, dokazana je prisutnost specifičnih insercijskih sekvencija u reprezentativnim izolatima u kojima je dokazan *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gen.

Kontrolne sojeve za TEM-1, TEM-2, SHV-1 i SHV-2 ustupio je prof. Adolf Bauernfeind (Max von Pettenkofer Institute, München, Njemačka), a za CTX-M-1 prof. Neil Woodford (Health Protection Agency, London, UK). Testiranje reprezentativnih izolata u svrhu dokaza *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena i pripadajućih insercijskih sekvenci provedeno je na Medicinskome sveučilištu u Grazu (Institute of Hygiene, Microbiology and Enviromental Medicine).

Tablica 4.1. Početnice upotrijebljene za dokaz *bla* gena

bla gen[*]	Početnice F[†] i R[‡]	Redoslijed sekvencija	Protokol PCR[§] reakcije	Očekivana veličina produkta (bp[‖])
bla$_{TEM}$	TEM - F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	58°C	1080 bp
	TEM - R	GACAGTTACCAATGCTTAATC	58◦C	
bla$_{SHV}$	SHV - F	TGGTTATGCGTTATATTCGCC	94°C 94°C 68°C	865 bp
	SHV - R	GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	72°C 72°C	
bla$_{CTX-M}$	CTX-M - F	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	94°C 94°C 60°C	543 bp
	CTX-M - R	CCGCRATATCRTTGGTGGTG	72°C 72°C	
bla$_{CTX-M-1}$	CTX-M-1- F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	94°C 94°C 55°C	415 bp
	CTX-M-1- R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	72°C 72°C	
bla$_{OXA-48}$	OXA48 - F	ATGCGTGTATTAGCCTTATC	95°C 95°C	781 bp
	OXA48 - R	CTAGGGAATAATTTTTTCCT	55°C 72°C	
IS*26*[¶]	IS26 - F	GCGGTAAATCGTGGAGTGAT	96°C 50°C	400 bp
	IS26 - R	ATTCGGCAAGTTTTTGCTGT	50°C 72°C	
IS*Ecp*[¶]	IS*Ecp*1 - F	AATCTAACATCAAATGCAGG	96°C 50°C	583 bp
	IS*Ecp*1 - R	TTTTGCTGCAAGAAATACATA	50°C 72°C	
Tn*1999*[**]	Tn*1999* - F	CGTTCAGCA/TATATTGCA	95°C 50°C	985 bp
	Tn*1999* - R	GGCCGAGCA/CGTTCAGCA	50°C 72°C	

[*]gensko ishodište β-laktamaza; [†]forvard početnica; [‡]revers početnica; [§]lančana reakcija polimeraze; [‖]parovi baza; [¶]insercijska sekvencija; [**]transpozom

4.8. Određivanje inkompatibilne grupe plazmida multipleks-PCR metodom

PBRT metodom (engl. *PCR-Based Replicon Typing*) prema Carattoli primjenom multipleks PCR-a određene su inkompatibilne grupe plazmida (102, 107). Za ekstrakciju plazmida korišten je Qiagen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputi proizvođača. Pet multipleks i dva simpleks PCR-a provedena su u svrhu dokaza plazmidnih grupa i pojedinačnih plazmida. Pripadnost inkompatibilnoj grupi temelji se na veličini PCR produkta. Ekstrahirani plazmidi podvrgnuti su elektoforezi u 0,7 % agaroznome gelu te potom obojani etidij-bromidom. Ovisno o broju baznih parova u plazmidu, tj. veličini produkta dobivenoga PCR-om, tijekom izlaganja struji produkti putuju na različite udaljenosti u agaroznom gelu što se uspoređuje s udaljenošću koju postiže kontrolni soj poznatih plazmidnih grupa. U svrhu kontrole primijenjen je standardizirani soj *E. coli* NTCC 25923 s četirima poznatim plazmidima. Budući da je u prethodnim istraživanjima primijećeno da PBRT metoda može biti neučinkovita u razlikovanju vrsta IncL i IncM plazmida u $bla_{\text{OXA-48}}$ pozitivnih izolata, primijenjena je ažurirana metoda za njihovu identifikaciju (108).

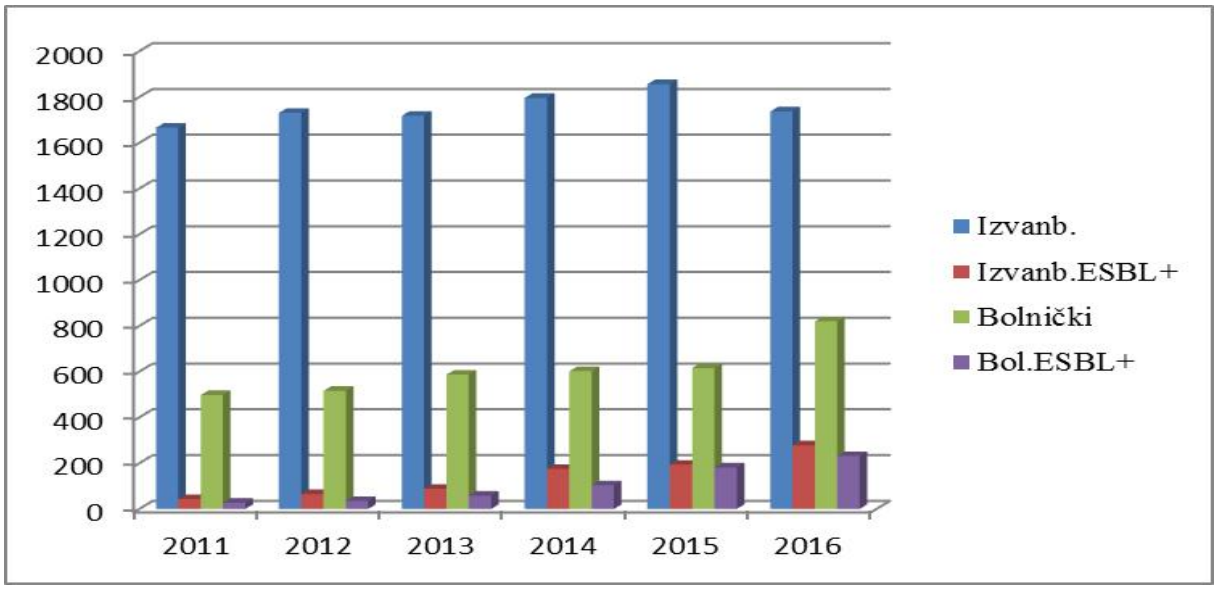
Kontrolne sojeve poznatih inkompatibilnih grupa plazmida ustupila je prof. dr. A. Carattoli, Istituto Superiore di Sanità, Rim, Italija.

4.9. Statistička obrada podataka

Osnovni podatci o izolatima i rezultati provedenoga ispitivanja prikazani su grafički i tablično te su obrađeni deskriptivnom statistikom. Vrijednosti kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom ili Fischerovim egzaktnim testom za tablice kontingencije kod maloga broja uzoraka. Razina značajnosti bila je definirana na $p < 0,05$. Podatci će se statistički obraditi upotrebom informatičkoga programa SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) i Microsoft Office Excel tabličnoga kalkulatora.

5. REZULTATI

Povećana incidencija ESBL producirajuće *E. coli* među bolničkim i izvanbolničkim izolatima na području Brodsko-posavske županije uočena je u drugoj polovici 2015. godine s istim trendom pojavnosti u 2016. godini tijekom koje su skupljeni studijski izolati. Povećanje incidencije ESBL producirajuće *E. coli* prikazano je na Slici 5.1.



Slika 5.1. Kretanje bolničkih i izvanbolničkih izolata *E. coli* ESBL (N) i *E. coli* (N) od 2011. do 2016. godine na području Brodsko-posavske županije

Tijekom studijskoga perioda izdvojena su 102 klinička izolata ESBL producirajuće *E. coli*, jedan izolat po pacijentu. Sedamdeset izolata prikupljeno je od hospitaliziranih pacijenata od čega 66 izolata od pacijenata hospitaliziranih u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu i 4 izolata pacijenata iz Opće bolnice *Vukovar* u Vukovaru. U istome periodu prikupljena su 32 izvanbolnička izolata, od čega 25 izolata s područja Brodsko-posavske županije i 7 izolata s područja Vukovarsko-srijemske županije, kao što je prikazano u Tablici 5.1.

Tablica 5.1. Podrijetlo *E. coli* ESBL producirajućih izolata (N = 102) zemljopisno i ishodišno (bolnički/izvanbolnički)

Ishodište izolata	**Bolnički izolati** N* (%)	**Izvanbolnički izolati** N* (%)	**Ukupno** N* (%)
Brodsko-posavska županija	66 (65 %)	25 (24 %)	91 (89 %)
Vukovarsko-srijemska županija	4 (4 %)	7 (7 %)	11 (11 %)
Ukupno	70 (68 %)	32 (32 %)	102 (100 %)

*broj izolata

Od ukupnoga broja izolata 91 izolat (89 %) potječe s područja Brodsko-posavske županije, a 11 (11 %) izolata s područja Vukovarsko-srijemske županije. Bolničkoga je podrijetla 70 (68,6 %) izolata, a izvanbolničkoga 32 (31,4 %) izolata. Ishodišno mjesto (anatomsko područje) s ili iz kojega je dobiven uzorak te podrijetlo pacijenata (bolnički/izvanbolnički) prikazani su u Tablici 5.2.

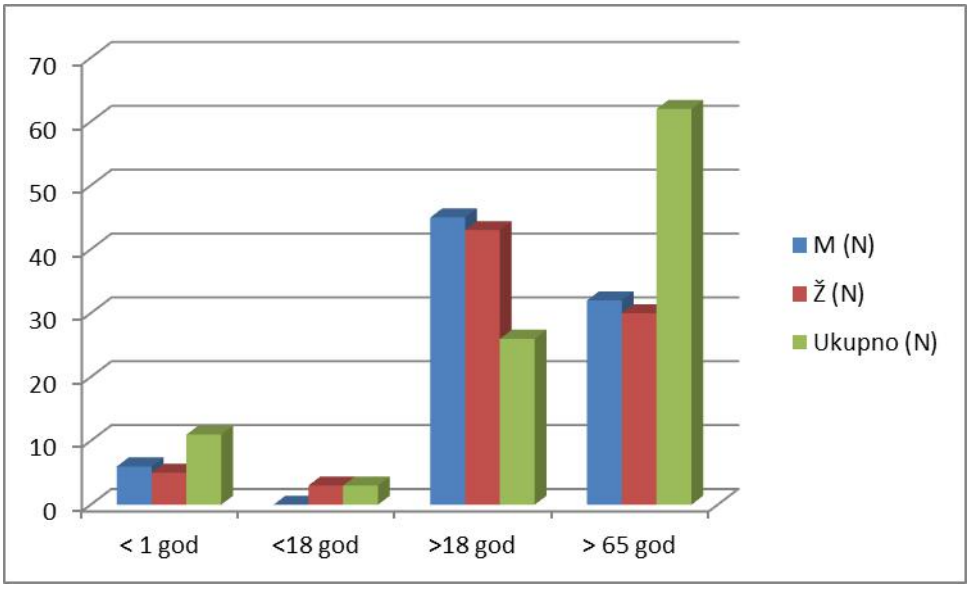
Tablica 5.2. Vrsta biološkoga uzorka, bolnički i izvanbolnički izolati

Vrsta biološkoga uzorka (N* = 102)	**Broj izolata**	**Bolnički izolati**	**Izvanbolnički izolati**
Hemokultura	21 (20,6 %)	21 (30 %)	0
Urinokultura	72 (70,6 %)	41 (58,6 %)	31 (96,8 %)
Obrisak rane	5 (5,0 %)	4 (5,7 %)	1 (3,2 %)
Sadržaj drena	2 (2,0 %)	2 (2,9 %)	0
Obrisak kože (nadzor)	1 (0.9 %)	1 (1,4 %)	0
Stolica (nadzor)	1 (0,9 %)	1 (1,4 %)	0
Ukupno	102 (100 %)	70 (100 %)	32 (100 %)

*broj izolata

Od ukupno 102 izolata 70 (68,6 %) je bolničkoga, a 32 (31,4 %) izvanbolničkoga podrijetla. Invazivnih je izolata bilo 21 (20,6 %). Invazivni izolati potječu iz uzoraka krvi za hemokulture pacijenata s kliničkom slikom bakterijemije ili sepse. Najčešći bolnički izolat ESBL *E. coli* dobiven je iz urina i iznosi 58,6 %. Unutar skupine izvanbolničkih uzoraka 96,8 % izolata potječe iz urina.

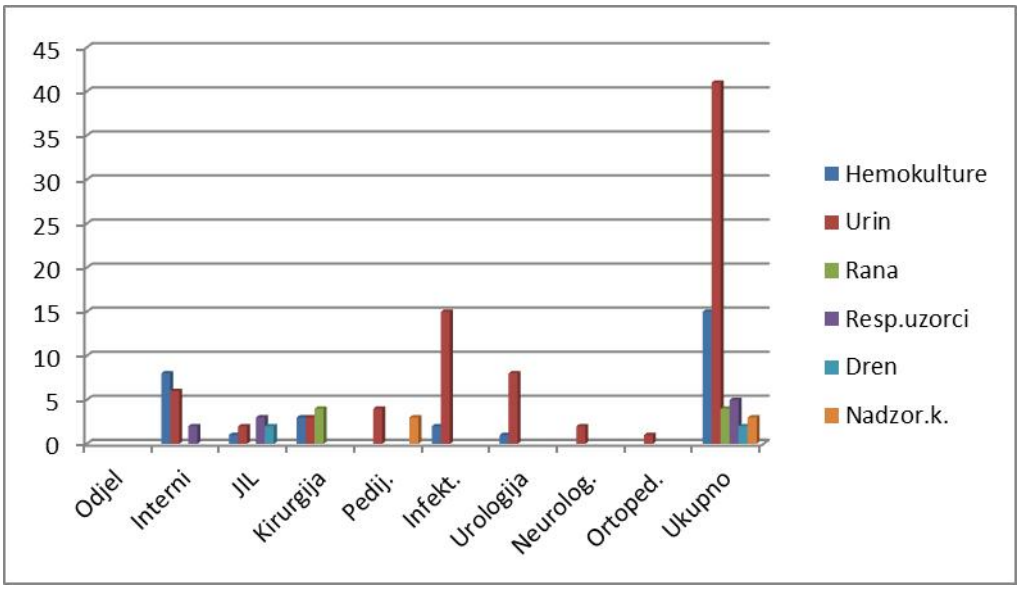
Distribucija pacijenata prema dobi i spolu prikazana je na Slici 5.2.



Slika 5.2. Distribucija pacijenata prema dobi i spolu (N = 102)

Uzorci su prikupljeni od 51 (50 %) muške i 51 (50 %) ženske osobe. Pacijenata je mlađih od 1 godine života 11 (10,8 %), mlađih od 18 godina 3 (2,9 %), osoba je starosne dobi 18 – 65 godina 26 (25,5 %), a osoba starijih od 65 godina 62 (60,8 %).

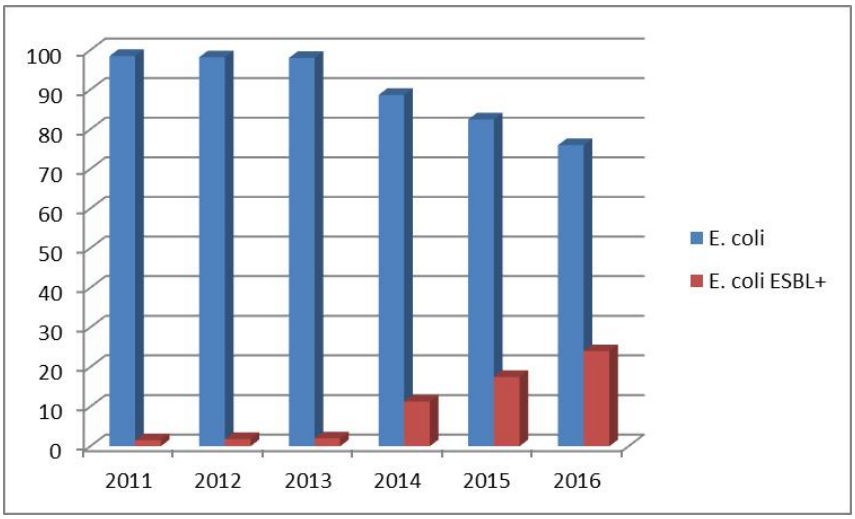
Distribucija izolata dobivenih od bolničkih pacijenata ovisno o ishodišnome odjelu i vrsti uzorka prikazana je na Slici 5.3.



Slika 5.3. Distribucija bolničkih izolata (N = 70) prema odjelima i vrsti uzorka

Najveći broj izolata potječe od pacijenata s Odjela za zarazne bolesti, N = 21 (30 %). Slijede izolati s Odjela za interne bolesti, N = 13 (18,6 %), Odjela za kirurgiju, N = 10 (14,2 %), Odjela za urologiju, N = 9 (12,9 %) i JIL-a, N = 8 (11,4 %). Manji broj izolata prikupljen je s Odjela za dječje bolesti, N = 6 (8,6 %), Odjela za neurološke bolesti, N = 2 (2,6 %) i Odjela za ortopediju, N = 1 (1,4 %).

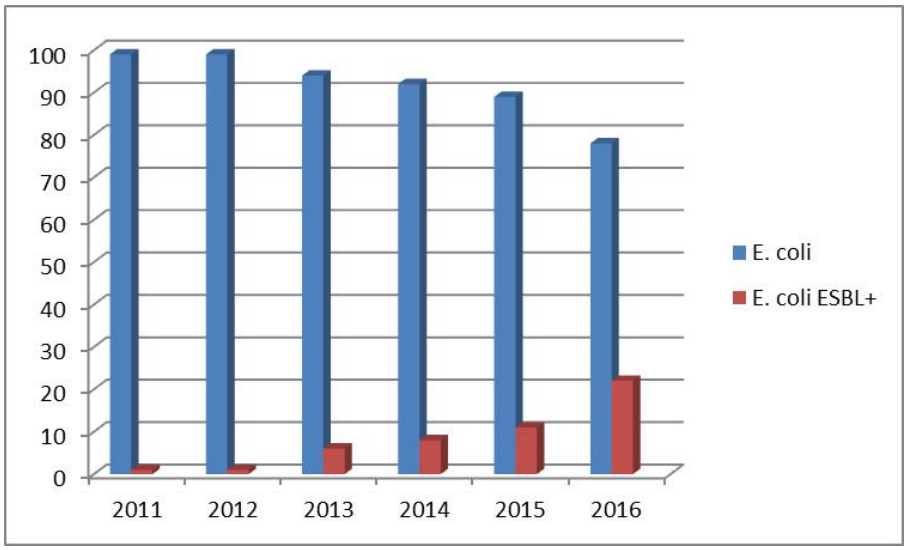
Rezultati šestogodišnjega praćenja otpornosti invazivnih izolata *E. coli*, kao i izolata iz drugih anatomskih područja, dobiveni su iz godišnjih izvještaja praćenjem lokalne mikrobiološke situacije, što je prikazano na Slici 5.4. i Slici 5.5.



Slika 5.4. Prikaz porasta izolata *E. coli* ESBL (%) na sve *E. coli* (%) iz primarno sterilnih uzoraka (hemokultura) hospitaliziranih pacijenata, OB *Dr. Josip Benčević*, Slavonski Brod

U periodu od 2011. do 2016. godine uočeno je povećanje ESBL producirajućih *E. coli* iz primarno sterilnih uzoraka (hemokultura). Sa svega 1,5 % izolata u 2011. godini učestalost *E. coli* ESBL u hemokulturama povećavala se na 17,5 % tijekom 2015. godine te na 24 % u 2016. godini.

Učestalost *E. coli* ESBL izolata u ostalim vrstama kliničkih uzoraka bolničkih pacijenata porasla je sa svega 1 % izolata tijekom 2012. i 2013. godine na više od 10 % izolata tijekom 2015. i 2016. godine, kao što je prikazano na Slici 5.5.



Slika 5.5. Usporedba porasta učestalosti izolata *E. coli* ESBL (%) na ukupne *E. coli* iz ostalih vrsta uzoraka hospitaliziranih pacijenata od 2011. do 2016. godine, OB *Dr. Josip Benčević*, Slavonski Brod

Učestalost izolacije *E. coli* ESBL u odnosu na dobro osjetljivu *E. coli* iz primarno sterlnih uzoraka (hemokultura) nastavljen je do druge polovice 2017. godine nakon čega je uočen pad učestalosti takvih izolata u hemokulturama.*

Uslijed povećanja broja ESBL producirajućih izolata iz uzoraka bolničkih i izvanbolničkih pacijenata povećala se bolničke potrošnja antibiotika iz skupine kinolona i karbapenema, kao što je prikazano u Tablici 5.3. Povećana potrošnja karbapenema posljedica je njihove češće terapijske primjene kod bolničkih pacijenata, ali i veće primjene u terapiji izvanbolničkih pacijenata kroz sustav dnevne bolnice.

*Podatci za 2017. i 2018. godinu nisu dio ove studije, ali daju značajan epidemiološki uvid u kretanje takve vrste izolata na nekome zemljopisnome području. Slični trendovi uočeni su u učestalosti MRSA izolata na našemu području i na drugim zemljopisnim područjima u Hrvatskoj (3).

Tablica 5.3. Potrošnja antibiotika u definiranim dnevnim dozama (DDD) u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* (od 2012. do 2016. godine)

Antibiotik	**2012.**	**2013.**	**2014.**	**2015.**	**2016.**
Ampicilin	37,1	30,3	40,8	132,9	322
Amokscilin/klavulanat	2701,4	2786	677,8	1843,1	611,3
Piperacilin/tazobaktam	25,8	43,5	7,3	4,9	17,1
Cefuroksim	1362	1125,8	776,8	804	826,1
Ceftriakson	464,9	316,4	394,5	378,4	502,1
Ceftazidim	2,7	0	1,3	0	0,3
Cefotaksim	0	0	0	0	0
Cefepim	981,5	509,5	76,6	39,5	19
Gentamicin	271,8	299,6	177,4	172	232,3
Kinoloni	683,5	624	564,3	714,9	1684,8
Imipenem	89,8	119,7	128,6	56,8	19,4
Meropenem	121,7	103,8	34,2	162,4	281
Ertapenem	620	340	513	835	1108
Ukupno	7362,2	6298,6	3392,6	5143,9	5623,4

5.1. Rezultati testiranja osjetljivosti na antibiotike

Osjetljivost izolata ESBL producirajuće *E. coli* na antibiotike utvrđena je disk-difuzijskom metodom i metodom mikrodilucije u bujonu.

5.1.1. Rezultati disk-difuzijske metode testiranja osjetljivosti

Rezultati testiranja osjetljivosti izolata bolničkih pacijenata disk-difuzijskom metodom dokazali su 100 % otpornost na ampicilin i sve cefalosporine od 1. do 3. generacije te 90 %-tnu otpornost na cefalosporin 4. generacije (cefepim). Otpornost izolata na β-laktamske antibiotike s inhibitorima (klavulanska kiselina i tazobaktam) iznosi 74,3 % za kombinaciju s klavulanskom kiselinom i 14 % za kombinaciju s tazobaktamom. Otpornost na kinolone dokazana je kod 91 % izolata, na sulfametoksazol/trimetoprim kod 93 % izolata, na gentamicin kod 90 % izolata i na amikacin kod 6 % izolata. Ovom metodom testiranja nije utvrđena otpornost na karbapeneme te su svi testirani izolati iskazali dobru osjetljivost na imipenem, meropenem i ertapenem. Cefoksitinski disk korišten je kao probirna metoda za

utvrđivanje prisutnosti AmpC β-laktamaza i bio je pozitivan kod 11,4 % izolata, ali dobiveni rezultat nije potvrđen modificiranim Hodge testom.

Izvanbolnički izolati također su iskazali 100 % otpornost na ampicilin i sve cefalosporine od 1. do 3. generacije te 75 % otpornost na cefalosporin 4. generacije (cefepim). Otpornost na β-laktamske antibiotike s inhibitorima (klavulanska kiselina i tazobaktam) iznosi 68,7 % za kombinaciju s klavulanskom kiselinom i 13 % za kombinaciju s tazobaktamom. Otpornost na kinolone dokazana je kod 87 % izolata, na sulfametoksazol/trimetoprim kod 94 % izolata, na gentamicin kod 81 % izolata dok na amikacin nisu dokazani otporni izolati. Otpornost na karbapeneme nije utvrđena. Testiranje cefoksitinskim diskom pokazalo je smanjenje zone oko diska kod 6,3 % izolata, ali nijedan nije potvrđen kao AmpC soj modificiranim Hodge testom.

Tablica 5.4. Prevalencija (%) otpornosti (R[*]) *E. coli* ESBL na ukupno testirane antibiotike (disk-difuzijska metoda)

Antibiotik	AMP[‡]	AMC[§]	CN[ǁ]	CXM[¶]	FOX[**]	CRO[††]	CAZ[‡‡]	FEP[§§]	CFM[ǁǁ]	PTZ[¶¶]	IMIP[***]	MEM[†††]	ERT[‡‡‡]	GEN[§§§]	AN[ǁǁǁ]	CIP[¶¶¶]	SXT[****]
Bolnički (N[†] = 70)	100	74,3	100	100	11,4	100	100	90	100	14	0	0	0	90	6	91	93
Izvanbol. (N[†] = 32)	100	68,7	100	100	6,3	100	100	75	100	13	0	0	0	81	0	87	94

[*]rezistentni (otporni) izolat; [†]broj izolata; [‡]ampicilin (10 µg); [§]amoksicilin/klavulanska kiselina (20/10 µg); [ǁ]cefaleksin (30 µg); [¶]cefuroksim (30 µg);

[**]cefoksitin – probirni disk (30 µg); [††]ceftriakson (30 µg); [‡‡]ceftazidim (30 µg); [§§]cefepim (30 µg); [ǁǁ]cefiksim (5 µg); [¶¶]piperacilin/tazobaktam (30/6 µg);

[***]imipenem (10 µg); [†††] meropenem (10 µg); [‡‡‡]ertapenem (10 µg); [§§§]gentamicin (10 µg); [ǁǁǁ]amikacin (30 µg); [¶¶¶]ciprofloksacin (5 µg);

[****]sulfometoksazol/trimetoprim (1,25/23,75 µg)

5.1.2. Rezultati osjetljivosti izolata metodom mikrodilucije u bujonu

Određivanje MIK-a za sve izolate provedeno je primjenom metode mikrodilucije u bujonu u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Tom metodom utvrđena je osjetljivost za sva 102 izolata od čega bolničkih (70) i izvanbolničkih (32) izolata *E. coli* ESBL na 15 antibiotika unutar kojih su zastupljene sve grupe, poput β-laktama, β-laktama u kombinaciji s inhibitorima (klavulanat, tazobaktam), aminoglikozida, fluorokinolona, sulfonamida i polimiksina.

Tablica 5.5. Antimikrobna osjetljivost (MIK) izolata ESBL producirajuće *E. coli* metodom mikrodilucije u bujonu bolničkih i izvanbolničkih izolata

	Prevalencija (%) otpornosti (R*) *E. coli* ESBL (N† = 102) na ukupno testirane antibiotike (MIK‡)														
Antibiotik	AMP§	AMC‖	CZ¶	CXM**	CTX††	CRO‡‡	CAZ§§	FEP‖‖	PTZ¶¶	IMIP***	MEM†††	ERT‡‡‡	GEN§§§	CIP‖‖‖	COL¶¶¶
Bolnički (N† = 70)	100	97	100	100	100	100	100	94	20	0	0	16	93	97	0
Izvanbolnički (N† = 32)	100	100	100	100	100	100	100	94	81	0	0	38	87	81	0

*rezistentni (otporni) izolat; †broj izolata; ‡minimalna inhibitorna koncentracija; §ampicilin; ‖amoksicilin/klavulanat; ¶cefazolin; **cefuroksim; ††cefotaksim; ‡‡ceftriakson; §§ceftazidim; ‖‖cefepim; ¶¶piperacilin/tazobaktam; ***imipenem; †††meropenem; ‡‡‡ertapenem; §§§gentamicin; ‖‖‖ciprofloksacin; ¶¶¶kolistin

Prema podatcima prikazanim u tablicama 5.4. i 5.5. vidljivo je da nema značajne razlike u osjetljivosti bolničkih izolata u odnosu na osjetljivost izvanbolničkih izolata. Uočeno je da su bolnički izolati iskazali manji postotak otpornosti na kombinaciju piperacilina s tazobaktamom (20 %) od izvanbolničkih izolata (81 %), kao i manju otpornost na ertapenem budući da je 16 % bolničkih i 38 % izvanbolničkih izolata bilo otporno na taj karbapenemski antibiotik.

Prijelomne točke testiranih antibiotika i rasponi MIK-a prikazani su u Tablici 5.6.

Tablica 5.6. Prijelomne točke testiranih antibiotika, raspon MIK-a, MIK_{50}, MIK_{90} za testirane izolate

Antibiotik (EUCAST* prijelomne točke)	**Raspon MIK† (S‡ – R§)**	**MIK_{50}**	**MIK_{90}**	**Broj (N) i postotak (%) rezistentnih izolata**
Cefuroksim (≥ 8)	4,0 - ≥ 128	≥ 128	≥ 128	102/102 (100/100)
Ceftazidim (≥ 4)	0,25 - > 128	16,0	≥ 128	102/102 (100/100)
Ceftriakson (≥ 2)	0,25 - > 128	≥ 128	≥ 128	102/102 (100/100)
Cefotaksim (≥ 2)	0,12 - > 128	≥ 128	≥ 128	102/102 (100/100)
Cefepim (≥ 4)	0,06 - 64,0	16,0	64	100/102 (98/100)
Amoksicillin/klavulanat (≥ 8)	4,0 - > 128	16,0	64	99/102 (97/100)
Piperacillin/tazobaktam (≥ 16)	1,0 - > 128	8,0	32	40/102 (39/100)
Imipenem ≥ 8	0,06 - 0,5	0,12	0,25	0/102 (0/100)
Meropenem ≥ 8	0,06 – 1,0	0,12	0,5	0/102 (0/100)
Ertapenem ≥ 1	0,06 – 2,0	0,5	1,0	25/102 (25/100)
Gentamicin ≥ 16	0,5 - ≥ 128	64,0	≥ 128	88/102 (86/100)
Ciprofloksacin ≥ 4	0,06 - ≥ 128	≥ 128	≥ 128	92/102 (90/100)
Colistin ≥ 2	0,06 - 0,25	0,12	0,25	0/102 (0/100)

*engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; †minimalna inhibitorna koncentracija; ‡osjetljivi izolat; §rezistentni (otporni) izolat

MIK_{50} za penicilinske antibiotike, amoksicilin-klavulanat, ESC grupu (engl. *extended-spectrum cephalosporins*), cefalosporine 4. generacije, ciprofloksacin i gentamicin veći je od prijelomnih točaka osjetljivosti po EUCAST-u, čime je potvrđena visoka otpornost na navedene antibiotike uočena već tijekom testiranja osjetljivosti disk-difuzijskom metodom te za navedene antibiotike iznosi od 88 % do 100 % otpornih izolata. MIK_{50} za piperacilin-tazobaktam iznosi 8 mg/L. Manji je od prijelomne točke prema EUCAST i ukazuje na dobru osjetljivost više od 50 % izolata. MIK_{50} za meropenem i imipenem iznosi 0,12 mg/L, za ertapenem 0,5 mg/L i ukazuje na dobru osjetljivost na sve karbapeneme za više od 50 % izolata. MIK_{90} je za piperacilin-tazobaktam 32 mg/L i iznosi dvostruko više od prijelomne točke prema EUCAST (16 mg/L) te ukazuje na 40 %-tnu otpornost na taj antibiotik. MIK_{90} za imipenem iznosi 0,25 mg/L, a za meropenem 0,5 mg/L, što je još uvijek znatno manje od vrijednosti prijelomnih točaka te ukazuje na 100 % osjetljivost izolata na ta dva antibiotika.

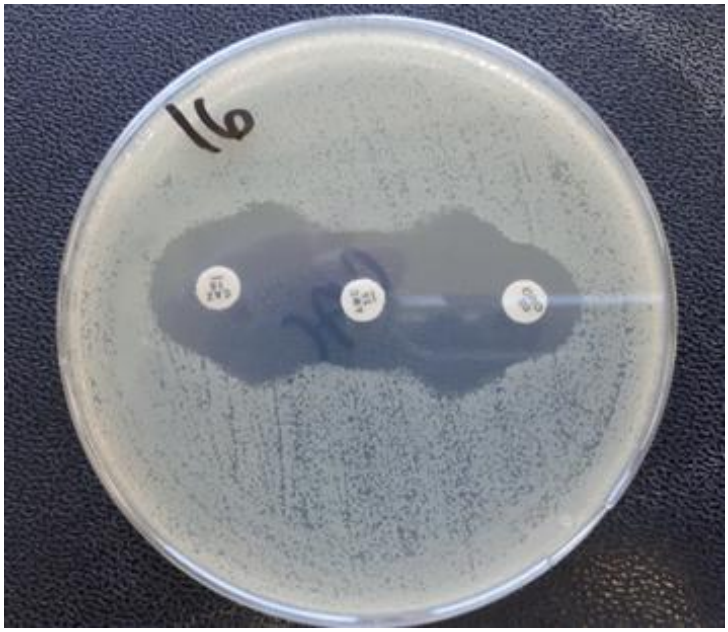
MIK_{90} za ertapenem iznosi 1 mg/L, što odgovara graničnoj vrijednosti osjetljivosti toga antibiotika prema EUCAST-u (R = ≥ 1 mg/L). Takvih je izolata 25 %. Na temelju toga možemo zaključiti da postoji *skrivena* otpornost na karbapeneme kod 25 % izolata koju nismo utvrdili disk-difuzijskom metodom. Da bismo utvrdili radi li se o hiperprodukciji enzima β-laktamaze ili genski posredovanoj otpornosti, provedena su dodatna fenotipska testiranja (CIM test i modificirani Hodge test za detekciju karbapenemaza), transkonjugacija s karbapenemima i molekularna analiza u svrhu dokaza prisutnosti gena nositelja otpornosti na karbapeneme (*bla*$_{CARBA}$).

Prikupljene izolate *E. coli* možemo prema Magiorakos definirati kao višestruko otporne jer pokazuju rezistenciju na najmanje jedan antibiotik iz tri porodice (109).

5.2. Rezultati fenotipskih testiranja

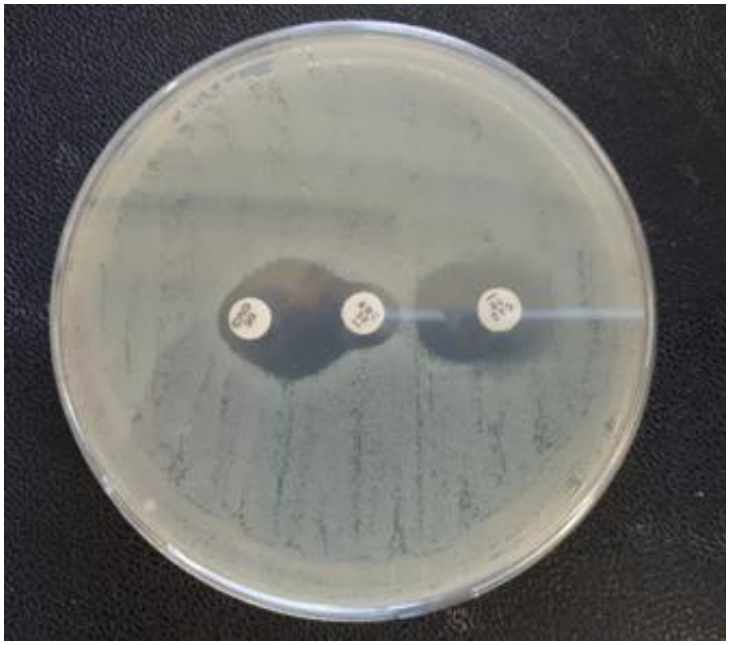
Metoda dvostrukoga diska i E-test ESBL

Metodom dvostrukoga diska (DDST) i E-test metodom potvrđena je prisutnost ESBL enzima kod svih izolata (100 %). Na Slici 5.6. i Slici 5.7. prikazan je DDST test na studijskim izolatima.



Slika 5.6. Metoda dvostrukoga diska (DDST) na M-H agaru

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)



Slika 5.7. Metoda dvostrukoga diska (DDST) na M-H agaru

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

Metoda E-testa (gradijentni test) korištena je kao potvrdna metoda za dokaz produkcije ESBL enzima. E-test bio je pozitivan kod svih izolata (N = 102). Na Slici 5.8. prikazan je E-test za studijski izolat.



Slika 5.8. E-test ESBL na M-H agaru

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

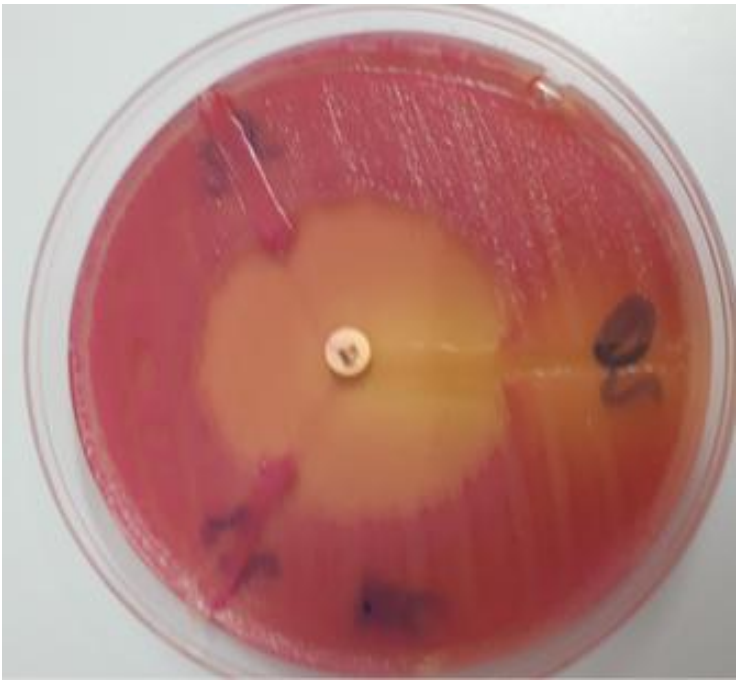
MIK omjeri CAZ/CAZ-CL korišteni su kao razlikovni kriterij te je rezultat pozitivan ako je MIK ceftazidima s klavulanatom za minimalno 3 razrjeđenja manji od MIK-a ceftazidima.

Modificirani Hodge test za dokaz AmpC β-laktamaza

Modificiranim Hodge testom nije potvrđena prisutnost AmpC β-laktamaza niti kod jednoga izolata iako je probirni test s cefoksitinskim diskom (FOX) ukazivao na moguću prisutnost navedenih enzima kod 17,7 % izolata.

Modificirani Hodge test za dokaz karbapenemaza

Mikrodilucijom u bujonu utvrđeno je 25 (25 %) izolata otpornih na ertapenem koji tijekom testiranja disk-difuzijskom metodom nisu ukazivali na smanjenu osjetljivost na karbapeneme. Da bismo fenotipski dokazali moguću prisutnost karbapenemaza, proveli smo testiranja za dokaz navedenih enzima.



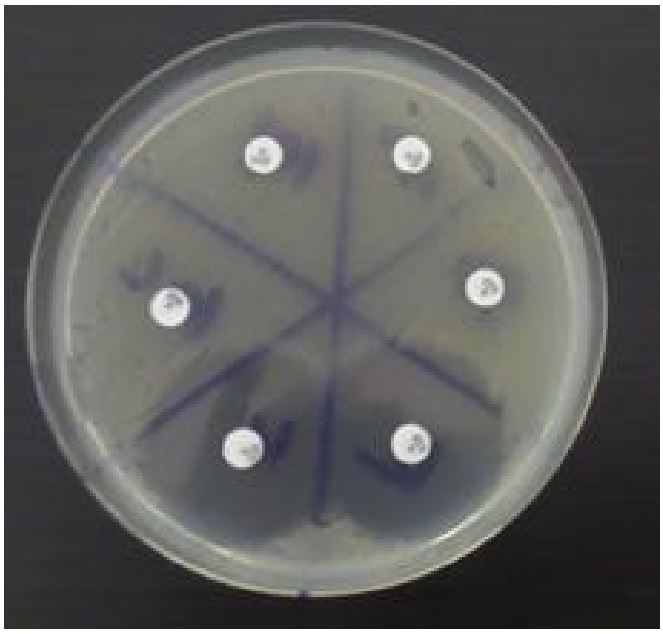
Slika 5.9. Modificirani Hodge test na McConkey agaru
(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

Na slici je prikazan modificirani Hodge test (MHT) s izolatima čija vrijednost MIK-a za ertapenem iznosi 1 mg/L, što upućuje na smanjenu osjetljivost na karbapeneme. Prisutnost

deformirane zone inhibicije poput *lista djeteline* upćuje na produkciju karbapenemaza. Testiranje je bilo pozitivno za svih 25 izolata.

Modificirani CIM test

Modificiranim CIM testom uz uporabu cefotaksima dokazali smo prisutnost hidrolizirajućih β-laktamaza, čime smo isključili prisutnost drugih mehanizama inaktivacije β-laktamskih antibiotika, poput promjene porina i(li) efluksa, i to kod svih izolata (N = 102).



Slika 5.10. Modificirani CIM test na M-H agaru
(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

CIM test

Izolate otporne na ertapenem (N = 25) testirali smo izvornom CIM metodom u svrhu potvrde otpornosti na karbapeneme prije molekularnih testiranja. Koristili smo disk ertapenema (10 μg) prema prethodno navedenome protokolu. Od ukupnoga broja testiranih izolata (N = 25) CIM test bio je pozitivan kod 20 izolata, od čega 11 bolničkih i 9 izvanbolničkih izolata.

Rezultati osjetljivosti izolata dobiveni mikrodilucijom u bujonu (MIK) i rezultati fenotipskih testiranja za bolničke izolate (N = 70) prikazani su u Tablici 5.7.

Tablica 5.7. Bolnički izolati, vrsta uzorka, MIK, rezultati potvrdnih fenotipskih testiranja (ESBL, AmpC, CIM)

Studijski broj izolata	Uzorak	Odjel	MIK‡														
			AMC§	TZP‖	CTX¶	CRO**	CAZ††	FEP‡‡	IPM§§	MEM‖‖	ERT¶¶	GM***	CIP†††	COL‡‡‡	ESBL§§§	AmpC‖‖‖	CIM¶¶¶
1*	Hemokultura	INT	8	4	> 128	> 128	32	16	0,12	0,06	0,12	64	> 128	0,06	+	-	-
2*	Hemokultura	INT	8	8	> 128	> 128	64	32	0,12	0,06	0,12	64	> 128	0,12	+	-	-
3*	Hemokultura	INT	4	4	> 128	64	16	16	0,06	0,06	0,06	64	> 128	0,06	+	-	-
4*	Hemokultura	INT	16	4	> 128	64	16	16	0,06	0,06	0,06	32	> 128	0,25	+	-	-
5*	Hemokultura	INT	16	4	> 128	> 128	32	16	0,06	0,06	0,12	64	> 128	0,12	+	-	-
6*	Hemokultura	INT	32	8	> 128	> 128	64	32	0,06	0,06	0,06	> 128	> 128	0,06	+	-	-
7*	Hemokultura	INT	32	8	> 128	> 128	32	16	0,06	0,06	0,06	> 128	> 128	0,12	+	-	-
8*	Hemokultura	INT	16	8	> 128	> 128	> 128	32	0,06	0,12	0,25	1	> 128	0,12	+	-	-
9*	Hemokultura	JIL	16	8	> 128	> 128	32	16	0,06	0,06	1	32	> 128	0,25	+	-	+
10*	Hemokultura	KIR	32	8	> 128	> 128	32	16	0,06	0,12	0,25	32	> 128	0,12	+	-	-
11*	Hemokultura	ZAR	16	8	> 128	64	32	16	0,06	0,06	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
12*	Hemokultura	ZAR	16	8	> 128	64	32	8	0,06	0,06	0,25	32	> 128	0,25	+	-	-
13*	Hemokultura	URL	32	4	> 128	> 128	32	32	0,12	0,06	0,12	32	> 128	0,12	+	-	-
14*	Hemokultura	KIR	16	4	> 128	> 128	16	16	0,25	0,06	0,5	> 128	> 128	0,06	+	-	-
15*	Hemokultura	INT	16	8	> 128	> 128	16	16	0,25	0,06	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
16*	Hemokultura	INT	8	4	> 128	> 128	32	64	0,12	0,12	1	32	> 128	0,25	+	-	+
17*	Hemokultura	JIL	8	4	> 128	> 128	8	64	0,25	0,06	1	64	> 128	0,12	+	-	-
18*	Hemokultura	JIL	32	8	> 128	> 128	32	64	0,5	0,5	1	64	> 128	0,12	+	-	+
19*	Hemokultura	JIL	32	4	> 128	> 128	16	64	0,25	0,12	0,5	64	> 128	0,25	+	-	-
20*	Hemokultura	ZAR	16	4	> 128	> 128	8	8	0,25	0,25	1	64	> 128	0,25	+	-	+
21*	Obrisak rane	KIR	16	4	> 128	> 128	16	8	0,12	0,12	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
22*	Obrisak rane	GIN	32	8	> 128	> 128	4	32	0,12	0,12	0,5	0.5	0,06	0,06	+	-	-
23*	Obrisak rane	KIR	32	4	> 128	> 128	32	32	0,25	0,06	1	64	32	0,06	+	-	+
24*	Obrisak rane	KIR	32	8	> 128	> 128	16	8	0,25	0,12	0,5	64	> 128	0,06	+	-	-
25*	Sadržaj drena	JIL	32	4	> 128	> 128	8	16	0,25	0,12	0,5	64	> 128	0,06	+	-	-
26*	Sadržaj drena	JIL	32	4	> 128	> 128	8	32	0,25	0,25	1	64	> 128	0,06	+	-	+
27*	Urin	ZAR	32	4	> 128	> 128	16	8	0,25	0,12	0,5	64	> 128	0,12	+	-	-
28*	Urin	ZAR	16	16	> 128	64	16	8	0,06	0,06	0,25	> 128	> 128	0,06	+	-	-
29*	Urin	ZAR	32	4	> 128	64	16	4	0,06	0,06	0,25	64	> 128	0,06	+	-	-
30*	Urin	ZAR	16	8	> 128	32	4	8	0,06	0,25	2	64	> 128	0,12	+	-	+
31*	Urin	ZAR	64	8	> 128	64	8	2	0,06	0,06	0,25	64	> 128	0,12	+	-	-
32*	Urin	ZAR	> 128	32	> 128	> 128	16	4	0,12	0,25	0,5	16	> 128	0,12	+	-	-
33*	Urin	ZAR	64	4	> 128	64	8	8	0,06	0,12	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+

Studijski broj izolata	Uzorak	Odjel	MIK‡														
			AMC§	TZP‖	CTX¶	CRO**	CAZ††	FEP‡‡	IPM§§	MEM‖‖	ERT¶¶	GM***	CIP†††	COL‡‡‡	ESBL§§§	AmpC‖‖‖	CIM¶¶¶
34*	Urin	ZAR	32	4	> 128	> 128	> 128	8	0,06	0,25	0,5	1	> 128	0,12	+	-	-
35*	Urin	ZAR	16	4	> 128	> 128	16	16	0,12	0,25	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
36*	Urin	ZAR	64	8	> 128	> 128	> 128	16	0,12	0,25	1	16	> 128	0,12	+	-	+
37*	Urin	ZAR	64	4	> 128	> 128	8	16	0,12	0,25	0,5	32	> 128	0,25	+	-	-
38*	Urin	ZAR	64	8	> 128	> 128	16	8	0,12	0,25	0,5	32	> 128	0,25	+	-	-
39*	Urin	ZAR	64	4	> 128	64	16	4	0,06	0,06	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
40*	Urin	ZAR	32	8	> 128	32	8	4	0,06	0,06	0,5	64	> 128	0,25	+	-	-
41*	Urin	ZAR	64	4	> 128	> 128	32	2	0,06	0,06	0,5	32	> 128	0,12	+	-	-
42*	Urin	ZAR	16	8	> 128	32	128	4	0,12	0,06	0,5	16	> 128	0,06	+	-	-
43*	Urin	ZAR	64	16	> 128	64	32	8	0,12	0,06	1	0.5	> 128	0,12	+	-	-
44*	Urin	JIL	64	2	> 128	64	32	4	0,25	0,25	0,5	16	> 128	0,12	+	-	-
45*	Urin	JIL	4	1	> 128	32	> 128	2	0,25	0,5	0,5	0.12	> 128	0,25	+	-	-
46*	Urin	ORT	8	2	> 128	64	> 128	4	0,25	0,5	0,5	0.5	> 128	0,25	+	-	-
47*	Urin	URL	16	4	> 128	64	8	8	0,25	0,25	1	16	> 128	0,25	+	-	+
48*	Urin	URL	16	4	> 128	64	16	8	0,25	0,25	0,12	64	> 128	0,25	+	-	-
49*	Urin	URL	32	8	> 128	64	16	8	0,5	0,5	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
50*	Urin	URL	16	8	> 128	64	16	8	0,25	0,12	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
51*	Urin	URL	16	4	> 128	64	4	8	0,06	0,06	0,5	32	> 128	0,25	+	-	-
52*	Urin	URL	32	16	> 128	32	8	4	0,06	0,06	0,25	> 128	> 128	0,25	+	-	-
53*	Urin	URL	16	8	> 128	64	4	4	0,06	0,12	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
54*	Urin	URL	8	8	> 128	64	8	8	0,12	0,12	0,12	> 128	> 128	0,25	+	-	-
55*	Urin	KIR	16	16	> 128	64	32	8	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,25	+	-	-
56*	Urin	KIR	16	4	> 128	4	32	2	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
57*	Urin	KIR	16	4	> 128	64	8	2	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
58*	Urin	NEUR	16	16	> 128	64	8	4	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
59*	Urin	PED	8	8	> 128	4	64	2	0,06	0,12	0,12	> 128	0,06	0,12	+	-	-
60*	Urin	PED	16	32	> 128	64	8	8	0,06	0,12	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	-
61*	Urin	PED	32	64	> 128	64	16	4	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
62*	Urin	PED	8	16	> 128	64	8	4	0,06	0,06	0,25	> 128	> 128	0,12	+	-	-
63*	Urin	INT	32	8	> 128	32	8	8	0,06	0,12	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	-
64*	Urin	INT	16	32	> 128	64	16	4	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
65*	Urin	INT	32	32	> 128	> 128	> 128	16	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-

Studijski broj izolata	Uzorak	Odjel	MIK‡													
			AMC§	TZP‖	CTX¶	CRO**	CAZ††	FEP‡‡	IPM§§	MEM‖‖	ERT¶¶	GM***	CIP†††	COL‡‡‡	ESBL§§§	AmpC‖‖‖	CIM¶¶¶
66*	Urin	INT	32	64	> 128	64	16	16	0,06	0,12	0,25	> 128	> 128	0,25	+	-	-
92†	Obrisak kože, VU	ROD	32	8	> 128	> 128	16	64	0,25	0,5	0,5	64	> 128	0,25	+	-	-
97†	Urin, VU	NEURO	32	32	> 128	> 128	64	64	0,25	0,5	1	64	> 128	0,25	+	-	+
99†	Stolica, VU	PED	64	> 128	> 128	> 128	64	64	0,25	0,5	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
102†	HK, Vukovar	KIR	32	8	> 128	> 128	> 128	64	0,25	0,5	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-

*OB *Dr. Josip Benčević*, Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija (BPŽ), izolati 1 - 66; †OB Vukovar, Vukovarsko-srijemska županija (VSŽ), izolati 92, 97, 99, 102; ‡minimalna inhibitorna konentracija (mikrodilucija u bujonu); §amoksicilin klavulanat; ‖piperacilin tazobaktam; ¶cefotaksim; **ceftriakson; ††ceftazidim; ‡‡cefepim; §§imipenem; ‖‖meropenem; ¶¶ertapenem; ***gentamicin; †††ciprofloksacin; ‡‡‡kolistin; §§§test za dokaz β-laktamaza proširenog spektra (ESBL); ‖‖‖ test za dokaz inducibilnih β-laktamaza (AmpC); ¶¶¶karbapenem inaktivacijski test

Rezultati osjetljivosti izolata dobiveni mikrodilucijom u bujonu (MIK) i rezultati fenotipskih testiranja za izvanbolničke izolate (N = 32) prikazani su u Tablici 5.8.

Tablica 5.8. Izvanbolnički izolati, vrsta uzorka, MIK, rezultati potvrdnih fenotipskih testiranja (ESBL, AmpC,CIM)

Studijski broj izolata	Uzorak	Županija	MIK‡														
			AMC§	TZP‖	CTX¶	CRO**	CAZ††	FEP‡‡	IPM§§	MEM‖‖	ERT¶¶	GM***	CIP†††	COL‡‡‡	ESBL§§§	AmpC‖‖‖	CIM¶¶¶
67*	Urin	BPŽ*	32	32	> 128	64	16	8	0,06	0,25	0,25	> 128	> 128	0,12	+	--	-
68*	Urin	BPŽ*	16	8	> 128	128	4	8	0,06	0,25	0,12	0,25	0,12	0,06	+	-	-
69*	Urin	BPŽ*	32	16	> 128	32	16	4	0,06	0,12	0,12	> 128	> 128	0,12	+	-	-
70*	Urin	BPŽ*	32	16	> 128	> 128	> 128	4	0,06	0,06	0,12	1	0,5	0,12	+	-	-
71*	Urin	BPŽ*	> 128	32	> 128	32	32	32	0,06	1	1	4	0,12	0,12	+	-	+
72*	Urin	BPŽ*	> 128	32	> 128	> 128	64	64	0,25	0,12	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	-
73*	Urin	BPŽ*	> 128	64	> 128	> 128	64	64	0,5	0,06	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	-
74*	Urin	BPŽ*	> 128	16	> 128	> 128	16	64	0,25	0,12	0,5	4	0,25	0,12	+	-	-
75*	Urin	BPŽ*	> 128	32	32	32	16	4	0,25	0,25	0,5	8	0,25	0,12	+	-	-
76*	Urin	BPŽ*	> 128	32	> 128	> 128	32	64	0,25	0,5	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+
77*	Urin	BPŽ*	64	32	> 128	> 128	64	64	0,25	0,5	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+
78*	Urin	BPŽ*	64	16	> 128	> 128	16	32	0,25	0,5	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+
79*	Urin	BPŽ*	32	4	> 128	> 128	8	8	0,25	0,12	1	64	32	0,06	+	-	-
80*	Urin	BPŽ*	> 128	8	> 128	> 128	64	64	0,25	0,5	1	2	> 128	0,12	+	-	+
81*	Urin	BPŽ*	> 128	32	> 128	> 128	32	64	0,25	0,5	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	-
82*	Urin	BPŽ*	32	16	> 128	32	8	4	0,06	0,12	0,25	> 128	> 128	0,25	+	-	-
83*	Urin	BPŽ*	32	32	> 128	> 128	32	16	0,06	0,12	0,25	64	> 128	0,25	+	-	-
84*	Urin	BPŽ*	16	32	> 128	64	16	16	0,06	0,06	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
85*	Urin	BPŽ*	32	16	> 128	64	8	4	0,06	0,12	0,25	1	> 128	0,25	+	-	-
86*	Urin	BPŽ*	32	16	> 128	64	8	8	0,06	0,12	0,5	> 128	> 128	0,25	+	-	-
87*	Urin	BPŽ*	16	32	> 128	32	16	4	0,06	0,06	0,12	> 128	> 128	0,25	+	-	-
88*	Urin	BPŽ*	32	32	> 128	64	8	8	0,06	0,06	0,25	64	> 128	0,25	+	-	-
89*	Urin	BPŽ*	8	16	> 128	> 128	16	4	0,06	0,06	0,25	> 128	> 128	0,25	+	-	-
90*	Urin	BPŽ*	32	32	> 128	> 128	8	4	0,06	0,12	0,25	64	> 128	0,25	+	-	-
91*	Urin	BPŽ*	64	32	> 128	> 128	32	16	0,06	0,12	0,5	64	> 128	0,25	+	-	-
93†	Urin	VSŽ†	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	64	0,25	0,5	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+
94†	Urin	VSŽ†	16	16	> 128	> 128	16	32	0,25	0,5	1	> 128	0,06	0,12	+	-	+
95†	Urin	VSŽ†	16	8	> 128	> 128	16	0,25	0.25	0.25	0,5	4	0,06	0,12	+	-	-

Studijski broj izolata	Uzorak	Županija	MIK‡													
			AMC§	TZP‖	CTX¶	CRO**	CAZ††	FEP‡‡	IPM§§	MEM‖‖	ERT¶¶	GM***	CIP†††	COL‡‡‡	ESBL§§§	AmpC‖‖‖	CIM¶¶¶
96†	Urin	VSŽ†	16	32	> 128	> 128	32	32	0,25	0,25	0,5	> 128	> 128	0,12	+	-	--
98†	Rana	VSŽ†	32	64	> 128	> 128	64	32	0,12	0,5	1	> 128	> 128	0,25	+	-	+
100†	Urin	VSŽ†	32	32	> 128	> 128	> 128	64	0,5	1	1	> 128	> 128	0,12	+	-	+
101†	Urin	VSŽ†	32	16	> 128	> 128	> 128	64	0,25	0,5	1	> 128	> 128	0,25	+	-	-

*Brodsko-posavska županija (BPŽ), izolati 67 – 91; †Vukovarsko-srijemska županija (VSŽ), izolati 93 – 96, 100 – 101; ‡minimalna inhibitorna konentracija (mikrodilucija u bujonu); §amoksicilin klavulanat; ‖piperacilin tazobaktam; ¶cefotaksim; **ceftriakson, ††ceftazidim; ‡‡cefepim; §§imipenem; ‖‖meropenem; ¶¶ertapenem; ***gentamicin; †††ciprofloksacin; ‡‡‡ kolistin; §§§test za dokaz β-laktamaza proširenog spektra (ESBL); ‖‖‖ test za dokaz inducibilnih β-laktamaza (AmpC); ¶¶¶ karbapenem inaktivacijski test

5.3. Rezultati prijenosa otpornosti na antibiotike transkonjugacijom

Prijenos transkonjuganata (plazmida) dokazan je kod 66 od 102 izolata s rasponom frekvencije od 10^{-2} do 10^{-5}. Dobiveni transkonjuganti imali su isti fenotip cefalosporinske otpornosti kao donori. Prijenos otpornosti na ne-β-laktamske antibiotike testirana je disk-difuzijskom metodom. Otpornost na ciprofloksacin, gentamicin i trimetoprim/sulfametoksazol prenesena je istovremeno s otpornošću na cefotaksim kod 63 izolata. Prilikom uporabe meropenema kao inhibitora rasta donora svih 25 izolata otpornih na ertapenem prenijelo je karbapenemsku otpornost na *E. coli* primatelja (recipijenta) s rasponom frekvencije od 3×10^{-5} do 10^{-5}. Otpornost na tetraciklin prenesena je s otpornošću na cefotaksim kod 24 izolata, a otpornost na kloramfenikol kod 12 izolata. Rezultati frekvencija transkonjugacije bolničkih i izvanbolničkih izolata prikazani su u Tablici 5.9. i Tablici 5.10.

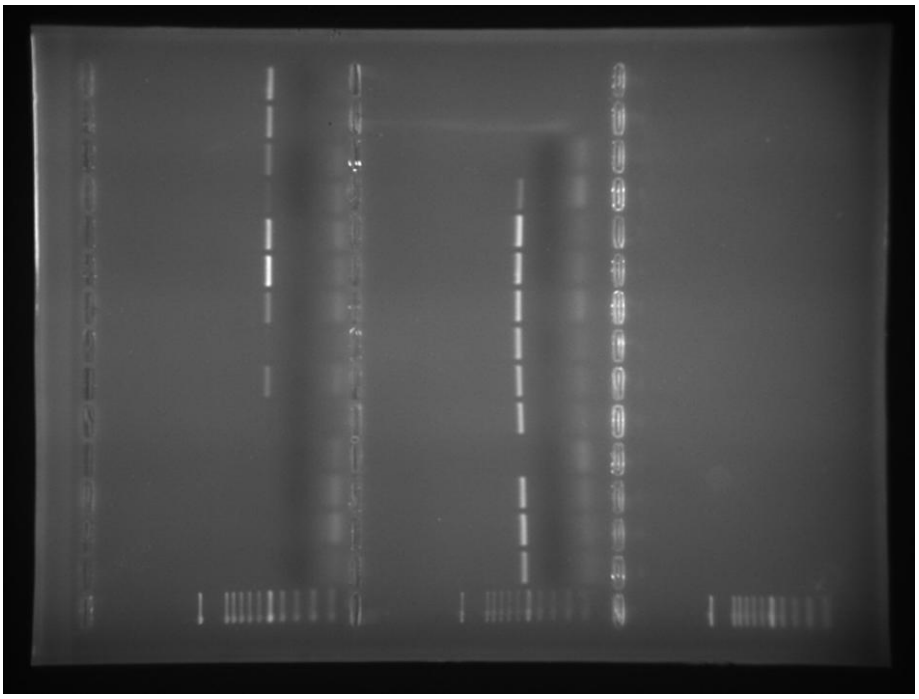
5.4. Rezultati molekularne karakterizacije β-laktamaza proširenoga spektra (*bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{CTX–M}}$, *bla*$_{\text{OXA-48}}$)

Utvrđivanje prisutnosti specifičnih *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena provedena je PCR metodom s početnicama za *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{CTX-M}}$, a nakon dobivenih rezultata testiranja osjetljivosti mikrodilucijom u bujonu i određivanjem MIK-a dodatno je provedeno utvrđivanje prisutnosti *bla*$_{\text{CARBA}}$ gena kod ertapenem rezistentnih izolata. Dodatno sekvencioniranje u svrhu dokaza prisutnosti *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gena provedeno je na 35 izolata, od čega 23 bolnička i 12 izvanbolničkih. Na 7 izolata provedeno je sekvencioniranje u svrhu dokaza *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena. Sekvencioniranje reprezentativnih izolata u svrhu dokaza *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ i *bla*$_{\text{OXA-48}}$ napravljeno je na Medicinskome sveučilištu u Gracu (Institute of Hygiene, Microbiology and Enviromental Medicine).

Molekularna tipizacija *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena pokazala je predominaciju *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ gena kod 102 (100 %) izolata. Istovremenu prisutnost *bla*$_{\text{CTX-M}}$ i *bla*$_{\text{TEM}}$ gena dokazali smo kod 48 izolata (47 %), s jednakom raspodjelom unutar skupine bolničkih i izvanbolničkih izolata (pola-pola). Kod 54 izolata (53 %), i to uglavnom iz urina bolničkih pacijenata (85 %), dokazan je samostalni *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gen. Od dvadeset pet izolata s graničnim vrijednostima MIK-a za ertapenem (1 mg/L) sedam je testirano na prisutnost *bla*$_{\text{CARBA}}$ gena i kod svih testiranih dokazana je prisutnost *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena. Sekvencioniranjem amplifikacijskih produkata 35 reprezentativnih uzoraka, 23 bolnička i 12 izvanbolničkih izolata, kod 34 izolata dokazan je *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gen, a kod jednog izolata *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ gen.

Rezultati PCR testiranja u svrhu dokaza *bla* gena prikazani su u Tablici 5.9. i Tablici 5.10.

Slika elektroforeze PCR produkata u svrhu određivanja vrste β-laktamaza prikazana je na Slici 5.11.



Slika 5.11. Elektroforeza PCR produkata za određivanje tipa β-laktamaza

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

Transkonjugacijom dobiveni sojevi pokazali su iste fenotipske i genotipske karakteristike kao i izvorni izolati. Kod transkonjuganata dobivenih uz upotrebu cefotaksima kao selektivnoga antibiotika dokazana je prisutnost *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gena dok je kod transkonjuganata dobivenih uz uporabu meropenema kao selektivnoga antibiotika dokazana prisutnost *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena.

Insercijska sekvenca IS*26* utvrđena je uzvodno od *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena kod 47 (53 %) od 88 testiranih izolata, a IS*Ecp* nađena je uzvodno od *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ kod 20 (59 %) od 34 izolata s dokazanim *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genom. Insercijska sekvenca IS*1999* prethodila je *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genu kod svih sedam izolata kod kojih je taj gen dokazan.

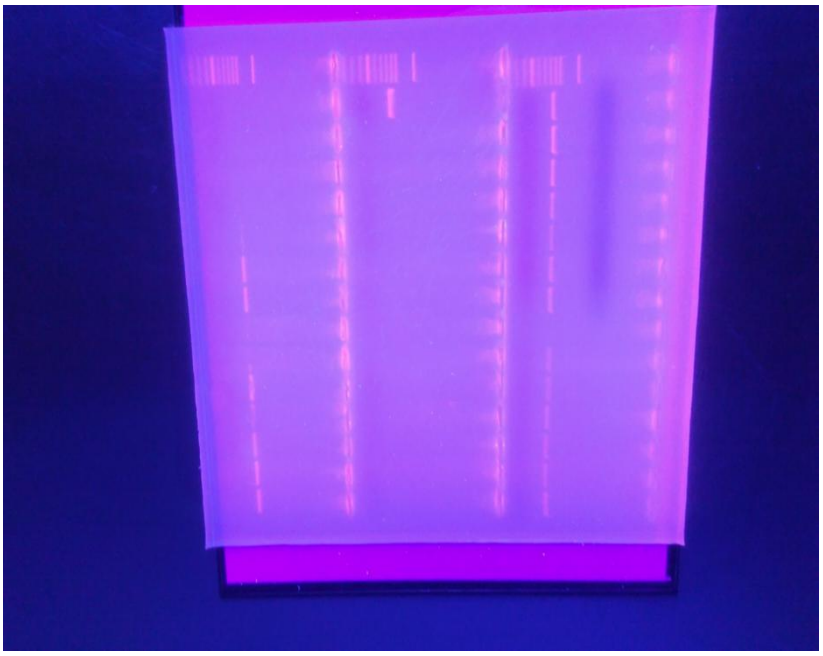
5.5. Rezultati određivanja inkompatibilnih grupa plazmida

PBRT metodom utvrdili smo prisutnost raznovrsnih plazmidskih grupa, a kod većine izolata istovremenu prisutnost više plazmidnih grupa. Plazmidne grupe zastupljene u izolatima pripadale su inkompatibilnim grupama IncA/C, IncB/O, IncFII, IncFIC, IncL, IncK/B, IncW i IncX. Od ukupno 102 studijska izolata 88 ih je testirano u svrhu dokaza plazmidnih grupa.

Najveći broj plazmida u studijskim izolatima pripada inkompatibilnoj grupi B/O veličine 80 kb – 150 kb i dokazanoj u 77 (87,5 %) od ukupno 88 izolata testiranih navedenom metodom. Po učestalosti je slijedi grupa IncW plazmida veličine oko 40 kb koja je prisutna kod 56 (64 %) izolata. Grupa IncA/C veličine 230 kb prisutna je kod 26 (30 %) izolata, grupa IncFII/IncFIC veličine 45 kb – 200 kb dokazana je kod 15 (17 %) izolata, grupa IncX veličine 30 kb – 50 kb dokazana je kod 12 (14 %) izolata i grupa IncK/B veličine 80 kb – 150 kb dokazana je kod 8 (9 %) izolata. IncL plazmid veličine 70 kb s produktom od 785 bp dokazan je kod 7 testiranih izolata iz skupine izolata s graničnim MIK-om za ertapenem i dokazanim *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genom.

Istovremena prisutnost dviju plazmidnih grupa, IncB/O i IncW, utvrđena je kod 31 izolata. Istovremena prisutnost triju plazmidnih grupa, i to IncB/O, IncW i IncA/C, utvrđena je kod 17 izolata, kao što je prikazano u Tablici 5.9. i Tablici 5.10.

Primjer elektroforeze PBRT-PCR produkata prikazan je na Slici 5.12.



Slika 5.12. Elektroforeza PBRT-PCR produkata

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

5.6. Rezultati genotipizacije PFGE i MLTS metodom

Od 102 studijska izolata obrađena PFGE metodom uspješno su se prikazala 93 izolata. Analiza dendrograma pokazala je postojanje 4 klonske grupe (klastera) s pripadajućim podgrupama koje sadrže klonski visoko srodne izolate i nekoliko skupina potpuno identičnih izolata (B14, C1, B25).

Klon A sadrži 5 podgrupa (A1 – A5) s izolatima studijskoga broja 50, 34, 33, 102, 35, 25, 51 i 101. Izolati klona A 50, 34, 33, 35, 25 i 51 potječu od pacijenata iz bolnice u Slavonskome Brodu, izolat 101 potječe iz hemokulture pacijenta s Odjela za kirurške bolesti (kirurgija) bolnice u Vukovaru, a izolat 102 potječe iz urina izvanbolničkoga pacijenta s područja Vukovarsko-srijemske županije.

Najveći broj izolata grupiran je u klonu B koji sadrži 34 podgrupe (B1 – B34) s 63 izolata: 52, 46, 59, 47, 68, 31, 30, 32, 40, 39, 66, 65, 19, 18, 20, 22, 38, 55, 44, 8, 7, 6, 5, 4, 57, 87, 97, 99, 98, 36, 69, 89, 2, 48, 71, 70, 82, 60, 85, 79, 84, 80, 78, 76, 75, 67, 62, 56, 93, 92, 90, 91, 72, 94,83, 45, 49, 58, 43, 64, 54, 42 i 37. U klonu B nalaze se izolati koji potječu od bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, i to s područja Brodsko-posavske i Vukovarsko-srijemske županije. Izolati 31 i 30 koji potječu s Odjela za zarazne bolesti (infektologija) identični su. Izolati 8, 7, 6, 5 i 4 koji potječu s Odjela za unutarnje bolesti (interni odjel) identični su, a dobiveni su u različitome periodu. Izolati 78, 76, 75, 67, 62, 56, 93 i 92 identični su, ali raznovrsnoga su ishodišta. Izolati 78, 76, 75 i 67 potječu od izvanbolničkih pacijenata s područja Brodsko-posavske županije, kao i izolat 93 koji je također izvanbolničkoga porijekla, ali s područja Vukovarsko-srijemske županije. Izolati 62 i 56 potječu od pacijenata bolnice u Slavonskome Brodu, a izolat 92 potječe od pacijenta bolnice u Vukovaru.

Klon C sadrži 6 podgrupa (C1 – C6) s izolatima 28, 27, 26, 24, 21, 14, 15, 13, 12, 10, 9, 3, 1, 23 i 17 koji potječu od pacijenata bolnice u Slavonskome Brodu. Izolati 14, 15, 13, 12, 10 i 9 identični su, ali potječu s različitih odjela i iz različitih su perioda. Ova skupina invazivnih izolata potječe iz hemokultura pacijenata s različitih odjela. Izolati 28, 27, 26, 24 i 21 identični su, a potječu od pacijenata s Odjela za zarazne bolesti (infektologija) i s Odjela za kirurške bolesti (kirurgija), također iz različitih perioda.

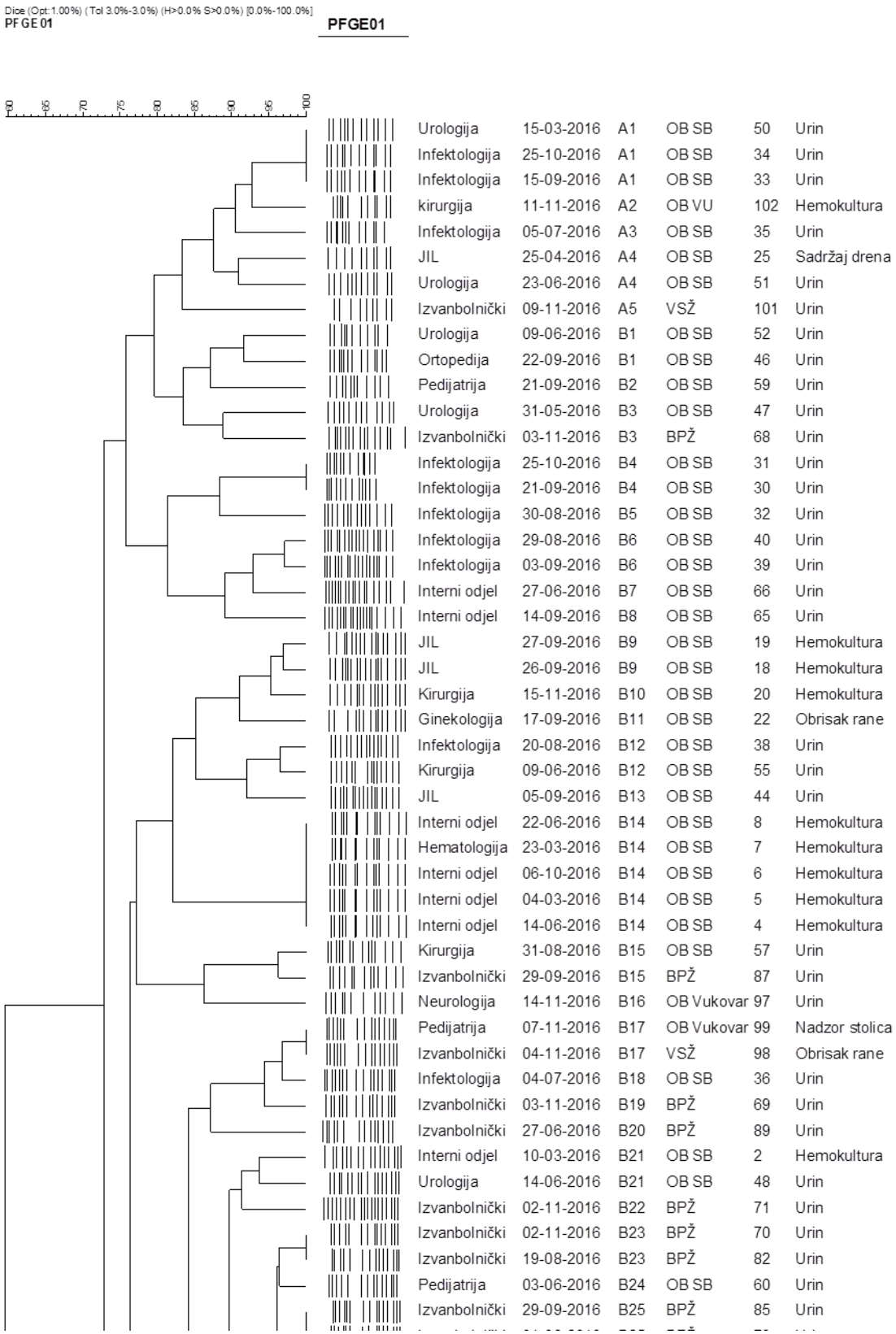
Klon D sadrži 2 podgrupe (D1 – D2) s izolatima 16, 73 i 53. Izolati 16 i 53 potječu iz hemokulture i urina pacijenata bolnice u Slavonskome Brodu, a izolat 73 potječe od izvanbolničkoga pacijenta s istoga područja.

Izolati 29, 41, 11, 53 i 88 singletoni su. Tri izolata, 29, 41 i 11 potječu s Odjela za zarazne bolesti bolnice u Slavonskome Brodu, izolat 53 potječe s Odjela za urološke bolesti iste bolnice, a izolat 88 iz urina izvanbolničkoga pacijenata s područja Brodsko-posavske županije.

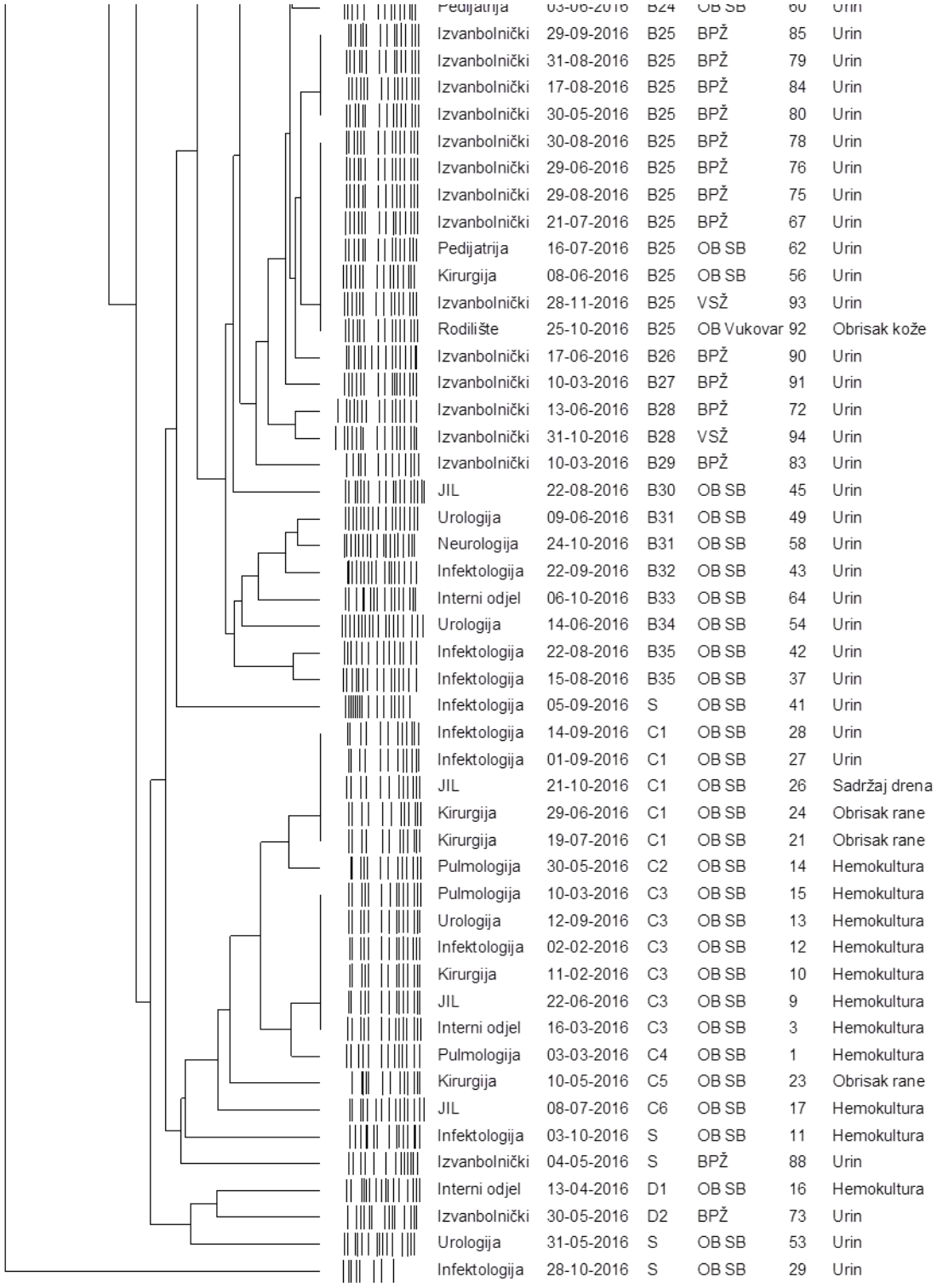
U dendrogramu nisu se prikazali izolati 61, 63, 74, 77, 81, 86, 95, 96, 100.

Pripadnost genotipovima prikazana je u Tablici 5.9. i Tablici 5.10.

Dendrogramski prikaz genotipizacije svih studijskih izolata (N = 93/102) prikazan je na Slici 5.13.



Urologija	15-03-2016	A1	OB SB	50	Urin
Infektologija	25-10-2016	A1	OB SB	34	Urin
Infektologija	15-09-2016	A1	OB SB	33	Urin
kirurgija	11-11-2016	A2	OB VU	102	Hemokultura
Infektologija	05-07-2016	A3	OB SB	35	Urin
JIL	25-04-2016	A4	OB SB	25	Sadržaj drena
Urologija	23-06-2016	A4	OB SB	51	Urin
Izvanbolnički	09-11-2016	A5	VSŽ	101	Urin
Urologija	09-06-2016	B1	OB SB	52	Urin
Ortopedija	22-09-2016	B1	OB SB	46	Urin
Pedijatrija	21-09-2016	B2	OB SB	59	Urin
Urologija	31-05-2016	B3	OB SB	47	Urin
Izvanbolnički	03-11-2016	B3	BPŽ	68	Urin
Infektologija	25-10-2016	B4	OB SB	31	Urin
Infektologija	21-09-2016	B4	OB SB	30	Urin
Infektologija	30-08-2016	B5	OB SB	32	Urin
Infektologija	29-08-2016	B6	OB SB	40	Urin
Infektologija	03-09-2016	B6	OB SB	39	Urin
Interni odjel	27-06-2016	B7	OB SB	66	Urin
Interni odjel	14-09-2016	B8	OB SB	65	Urin
JIL	27-09-2016	B9	OB SB	19	Hemokultura
JIL	26-09-2016	B9	OB SB	18	Hemokultura
Kirurgija	15-11-2016	B10	OB SB	20	Hemokultura
Ginekologija	17-09-2016	B11	OB SB	22	Obrisak rane
Infektologija	20-08-2016	B12	OB SB	38	Urin
Kirurgija	09-06-2016	B12	OB SB	55	Urin
JIL	05-09-2016	B13	OB SB	44	Urin
Interni odjel	22-06-2016	B14	OB SB	8	Hemokultura
Hematologija	23-03-2016	B14	OB SB	7	Hemokultura
Interni odjel	06-10-2016	B14	OB SB	6	Hemokultura
Interni odjel	04-03-2016	B14	OB SB	5	Hemokultura
Interni odjel	14-06-2016	B14	OB SB	4	Hemokultura
Kirurgija	31-08-2016	B15	OB SB	57	Urin
Izvanbolnički	29-09-2016	B15	BPŽ	87	Urin
Neurologija	14-11-2016	B16	OB Vukovar	97	Urin
Pedijatrija	07-11-2016	B17	OB Vukovar	99	Nadzor stolica
Izvanbolnički	04-11-2016	B17	VSŽ	98	Obrisak rane
Infektologija	04-07-2016	B18	OB SB	36	Urin
Izvanbolnički	03-11-2016	B19	BPŽ	69	Urin
Izvanbolnički	27-06-2016	B20	BPŽ	89	Urin
Interni odjel	10-03-2016	B21	OB SB	2	Hemokultura
Urologija	14-06-2016	B21	OB SB	48	Urin
Izvanbolnički	02-11-2016	B22	BPŽ	71	Urin
Izvanbolnički	02-11-2016	B23	BPŽ	70	Urin
Izvanbolnički	19-08-2016	B23	BPŽ	82	Urin
Pedijatrija	03-06-2016	B24	OB SB	60	Urin
Izvanbolnički	29-09-2016	B25	BPŽ	85	Urin



Slika 5.13. Dendrogramski prikaz svih studijskih izolata *E. coli* ESBL

Unutar skupine bolničkih izolata dendrogram je također pokazao postojanje četiriju grupa (klastera) s pripadajućim podgrupama koje sadrže klonski visoko srodne izolate i nekoliko skupina potpuno identičnih izolata (B14, C1, B25).

Klon A sadrži izolate 50, 34, 33, 102, 35, 25 i 51 koji su svrstani u 4 podgrupe i koji uglavnom potječu iz bolnice u Slavonskome Brodu, osim izolata 102 koji potječe od pacijenta bolnice u Vukovaru svrstan u podgrupu A2 čiji je jedinstveni predstavnik. Izolat 41 singleton (S) je i potječe s Odjela za zarazne bolesti (infektologija) bolnice u Slavonskome Brodu, ali srodan je ostalim izolatima grupe A.

Klon B sadrži najveći broj izolata, i to 52, 46, 59, 47, 57, 97, 42, 37, 62, 56, 92, 60, 48, 2, 49, 58, 43, 64, 54, 45, 36, 99, 19, 18, 20, 22, 38, 55, 44, 8, 7, 6, 5, 4, 31, 30, 32, 40, 39, 66 i 65. U klonu B nalazi se 28 podgrupa koje potječu iz različitih perioda i s različitih bolničkih odjela u Slavonskome Brodu. Izolati 4, 5, 6, 7 i 8 genski su identični i svrstani u podgrupu B14. U klonu B nalazi se izolat 97 svrstan u podgrupu B16 te izolat 99 svrstan u podgrupu B17 koji potječu iz bolnice u Vukovaru i jedinstveni su predstavnici tih podgrupa. Izolat 92 iz bolnice u Vukovaru srodan je izolatima 56 i 62 iz bolnice u Slavonskome Brodu.

Klon C sadrži izolate 15, 13, 12, 10, 9, 3, 14, 1, 28, 27, 26, 24, 21, 23 i 17 koji potječu iz bolnice u Slavonskome Brodu. U klonu C nalazi se 6 podgrupa od kojih podgrupa C3 sadrži izolate 3, 9, 10, 12, 13 i 15 s identičnim rasporedom nukleotida. Izolat 11 singleton je i potječe iz hemokulture pacijenta s Odjela za zarazne bolesti bolnice u Slavonskome Brodu, ali je vrlo srodan izolatima grupe C.

Klon D sadrži samo jedan izolat radnoga broja 16 koji potječe iz hemokulture pacijenta s Odjela za unutarnje bolesti (interni odjel) bolnice u Slavonskome Brodu. Njemu je vrlo srodan izolat 53 koji je singleton, a potječe iz urina pacijenta s Odjela za urološke bolesti (urologija) bolnice u Slavonskome Brodu.

Izolat 29 singleton je i potječe iz urina pacijenta s Odjela za zarazne bolesti (infektologija) bolnice u Slavonskome Brodu.

Pripadnost genotipovima bolničkih izolata prikazana je u Tablici 5.9.

Tablica 5.9. Rezultati transkonugacije, gensko ishodište β-laktamaza, PFGE, ST, PBRT, IS – bolnički izolati (N = 70)

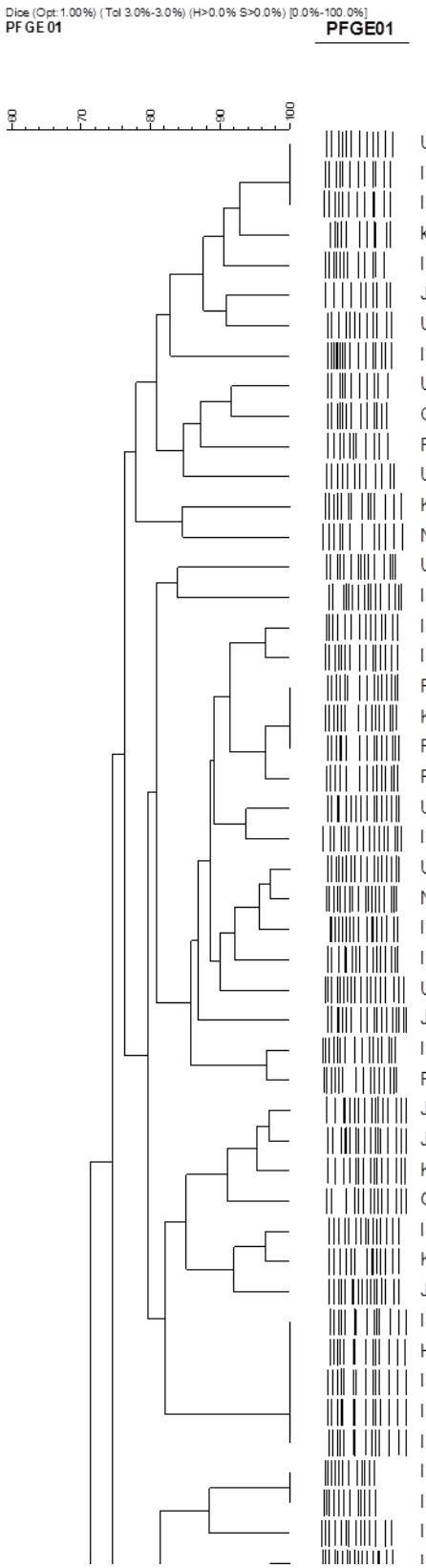
Studijski broj izolata	Uzorak	Odjel	*f*‡ Frekvencija konjugaije	Ishodište β-laktamaza *bla*§	PFGE‖ ST¶	PBRT**	IS*26*††	IS*EcP*††
1*	Hemokultura	Interni	$1{,}1x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	C4	W, B/O	neg	neg
2*	Hemokultura	Interni	$2{,}5x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	B21	W,A/C B/O	neg	neg
3*	Hemokultura	Interni	$2{,}1x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	C3	W, A/C, B/O	neg	neg
4*	Hemokultura	Interni	$3{,}6x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	B14	W, A/C, B/O	neg	neg
5*	Hemokultura	Interni	0	CTX-M-15	B14	X, B/O	IS26+	neg
6*	Hemokultura	Interni	0	CTX-M-1	B14	X, B/O	IS26+	neg
7*	Hemokultura	Interni	$2{,}5x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	B14	W, B/O	neg	neg
8*	Hemokultura	Interni	$4{,}5x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	B14	W, A/C, B/O	neg	neg
9*	Hemokultura	JIL	$2{,}7x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	C3 ST131	W, A/C, B/O, L	neg	neg
10*	Hemokultura	Kirurgija	$5{,}3x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-15	C3	W, B/O	IS26+	neg
11*	Hemokultura	Zaraza	10^{-4}	TEM-1 CTX-M-1	S	B/O	neg	neg
12*	Hemokultura	Zaraza	$5x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	C3	B/O	neg	neg
13*	Hemokultura	Urologija	$9{,}4x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-1	C3	W, B/O	neg	neg
14*	Hemokultura	Kirurgija	0	TEM-1 CTX-M-1	C2	W, B/O	IS26+	neg
15*	Hemokultura	Interni	0	TEM-1 CTX-M-1	C3	W, B/O	neg	neg
16*	Hemokultura	Interni	$1{,}2x10^{-2}$	CTX-M-15	D1 ST131	W, B/O,L	IS26+	ISEcP+
17*	Hemokultura	JIL	$1{,}2x10^{-2}$	CTX-M-15	C6	X, B/O, L	IS26+	ISEcP+
18*	Hemokultura	JIL	10^{-4}	CTX-M-15	B9	W, L	neg	neg
19*	Hemokultura	JIL	0	TEM-1 CTX-M-1	B9	W, B/O	IS26+	neg
20*	Hemokultura	Zaraza	0	TEM-1 CTX-M-15	B10	W, B/O, L	IS26+	ISEcP+
21*	Obrisak rane	Kirurgija	0	TEM-1 CTX-M-15	C1	W, A/C, B/O	IS26+	neg
22*	Obrisak rane	Ginekologija	$1{,}3x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-9	B11	FIC, A/C	IS26+	neg
23*	Obrisak rane	Kirurgija	$1{,}5x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	C5	FIC, A/C, B/O,L	neg	neg
24*	Obrisak rane	Kirurgija	0	TEM-1 CTX-M-1	C1	W, A/C, B/O	neg	neg
25*	Sadržaj drena	JIL	$1{,}1x10^{-2}$	TEM-1 CTX-M	A4	W, A/C, B/O	IS26+	neg
26*	Sadržaj drena	JIL	$8{,}5x10^{-3}$	TEM-1 CTX-M-15	C1	W, A/C, B/O,L	neg	neg
27*	Urin	Zaraza	$4{,}6x10^{-3}$	CTX-M-15	C1	W, A/C, K/B	IS26+	neg
28*	Urin	Zaraza	$1{,}4x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	C1	W, K/B	neg	neg
29*	Urin	Zaraza	$1{,}3x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	S	FIC, K/B	neg	neg
30*	Urin	Zaraza	$1{,}3x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	B4	FIC, K/B	neg	neg

Studijski broj izolata	Uzorak	Odjel	*f*‡ Frekvencija konjugaije	Ishodište β-laktamaza *bla*§	PFGE‖ ST¶	PBRT**	IS*26*††	IS*EcP*††
31*	Urin	Zaraza	$1,3x10^{-4}$	CTX-M-1	B4	W, B/O	IS26+	neg
32*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B5	ND§§	ND§§	ND§§
33*	Urin	Zaraza	$7,7x10^{-4}$	CTX-M-1	A1	W, B/O	IS26+	ISEcP+
34*	Urin	Zaraza	$1,6x10^{-2}$	CTX-M-1	A1	FIC, B/O	IS26+	neg
35*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	A3	W, B/O	IS26+	neg
36*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B18	X, B/O, L	IS26+	ISEcP+
37*	Urin	Zaraza	$2,4x10^{-4}$	CTX-M-1	B35	ND§§	ND§§	ND§§
38*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B12	W, B/O	IS26+	neg
39*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B6	ND§§	ND§§	ND§§
40*	Urin	Zaraza	$3,1x10^{-4}$	CTX-M-1	B6	ND§§	ND§§	ND§§
41*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	S	ND§§	ND§§	ND§§
42*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B35	X, B/O	IS26+	neg
43*	Urin	Zaraza	0	CTX-M-1	B32	ND§§	ND§§	ND§§
44*	Urin	JIL	0	CTX-M-1	B13	W, B/O	IS26+	neg
45*	Urin	JIL	0	CTX-M-1	B30	ND§§	ND§§	ND§§
46*	Urin	Ortopedija	$2,1x10^{-4}$	CTX-M-15	B1 ST131	W, B/O	IS26+	neg
47*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	B3	W, B/O, L	neg	ISEcP+
48*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	B21	ND§§	ND§§	ND§§
49*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	B31	W, B/O	IS26+	neg
50*	Urin	Urologija	$4x10^{-4}$	CTX-M-15	A1	ND§§	ND§§	ND§§
51*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	A4	ND§§	ND§§	ND§§
52*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	B1	X, B/O	IS26+	neg
53*	Urin	Urologija	0	CTX-M-1	D3	X, B/O	IS26+	neg
54*	Urin	Urologija	0	CTX-M-15	B34	ND§§	ND§§	ND§§
55*	Urin	Kirurgija	0	CTX-M-15	B12	W, B/O	IS26+	neg
56*	Urin	Kirurgija	$1,2x10^{-4}$	CTX-M-1	B25	W, B/O	neg	ISEcP+
57*	Urin	Kirurgija	0	CTX-M-1	B15	X, B/O	IS26+	neg
58*	Urin	Neurologija	0	CTX-M-15	B31	FIC, B/O	IS26+	neg
59*	Urin	Pedijatrija	0	CTX-M-1	B2	W, B/O	IS26+	neg
60*	Urin	Pedijatrija	$5x10^{-4}$	CTX-M-15	B24	W, B/O	IS26+	neg
61*	Urin	Pedijatrija	0	CTX-M-1	NPD‡‡	X, B/O	IS26+	neg
62*	Urin	Pedijatrija	0	CTX-M-1	B25	ND§§	ND§§	ND§§
63*	Urin	Interni	0	CTX-M-15	NPD‡‡	X, B/O	IS26+	neg
64*	Urin	Interni	0	CTX-M-1	B33	ND§§	ND§§	ND§§
65*	Urin	Interni	0	CTX-M-1	B8	W, B/O	IS26+	neg
66*	Urin	Interni	0	CTX-M-1	B7	W, B/O	IS26+	neg
92†	Obrisak kože, Vukovar	Rodilište	$5x10^{-3}$	CTX-M-15	B25	W, A/C B/O	IS26+	ISEcP+
97†	Urin, Vukovar	Neurologija	0	CTX-M-15	B16	B/O	neg	ISEcP+
99†	Stolica, Vukovar	Pedijatrija	$2,2x10^{-3}$	CTX-M-15	B17	B/O, FIC	IS26+	ISEcP+
102†	HK, Vukovar	Kirurgija	$3,3x10^{-4}$	CTX-M-15	A2	FIC, B/O, L	neg	ISEcP+

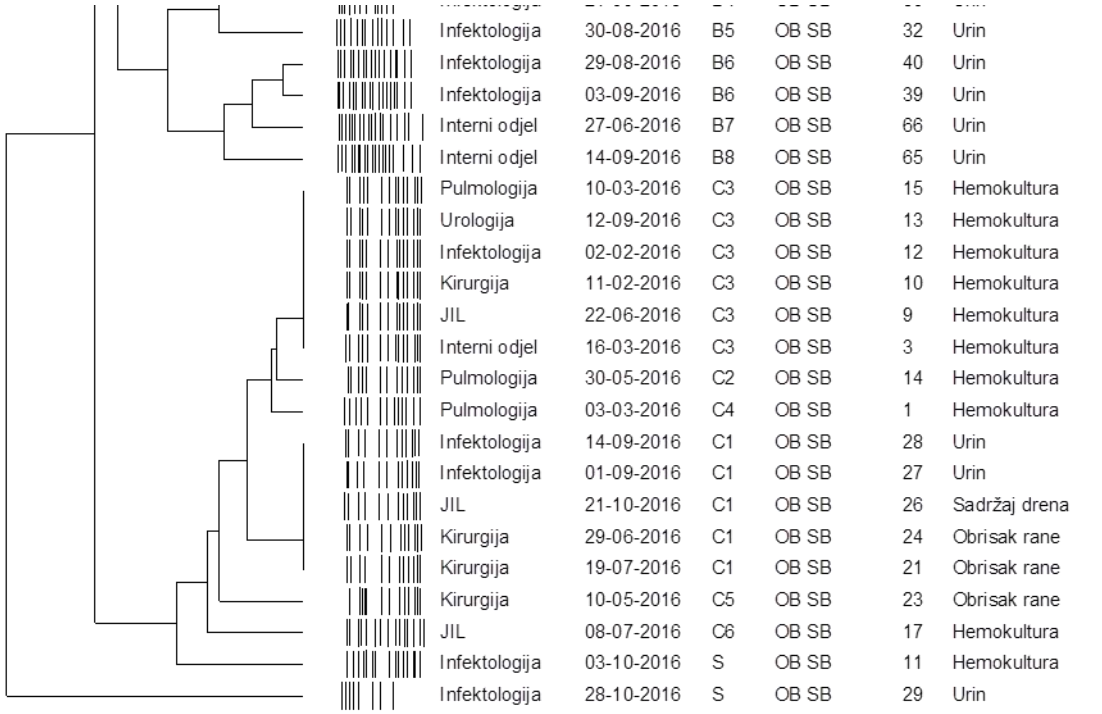
*OB *Dr. Josip Benčević*, Slavonski Brod, Brodsko-posavska županija, izolati 1 - 66; †OB *Vukovar*, Vukovarsko-srijemska županija, izolati 92, 97, 99 i 102; ‡frekvencija konjugacije; §gensko ishodište β-laktamaza; ‖pulsna elektroforeza u gelu; ¶sekvencijski tip; **tipiziranje

replikona; ††insercijska sekvencija; ‡‡nije prikazan u dendrogramu; §§nije obrađen PBRT metodom

Dendrogramski prikaz genotipizacije bolničkih izolata prikazan je na Slici 5.14.



Urologija	15-03-2016	A1	OB SB	50	Urin
Infektologija	25-10-2016	A1	OB SB	34	Urin
Infektologija	15-09-2016	A1	OB SB	33	Urin
kirurgija	11-11-2016	A2	OB VU	102	Hemokultura
Infektologija	05-07-2016	A3	OB SB	35	Urin
JIL	25-04-2016	A4	OB SB	25	Sadržaj drena
Urologija	23-06-2016	A4	OB SB	51	Urin
Infektologija	05-09-2016	S	OB SB	41	Urin
Urologija	09-06-2016	B1	OB SB	52	Urin
Ortopedija	22-09-2016	B1	OB SB	46	Urin
Pedijatrija	21-09-2016	B2	OB SB	59	Urin
Urologija	31-05-2016	B3	OB SB	47	Urin
Kirurgija	31-08-2016	B15	OB SB	57	Urin
Neurologija	14-11-2016	B16	OB Vukovar	97	Urin
Urologija	31-05-2016	S	OB SB	53	Urin
Interni odjel	13-04-2016	D1	OB SB	16	Hemokultura
Infektologija	22-08-2016	B35	OB SB	42	Urin
Infektologija	15-08-2016	B35	OB SB	37	Urin
Pedijatrija	16-07-2016	B25	OB SB	62	Urin
Kirurgija	08-06-2016	B25	OB SB	56	Urin
Rodilište	25-10-2016	B25	OB Vukovar	92	Obrisak kože
Pedijatrija	03-06-2016	B24	OB SB	60	Urin
Urologija	14-06-2016	B21	OB SB	48	Urin
Interni odjel	10-03-2016	B21	OB SB	2	Hemokultura
Urologija	09-06-2016	B31	OB SB	49	Urin
Neurologija	24-10-2016	B31	OB SB	58	Urin
Infektologija	22-09-2016	B32	OB SB	43	Urin
Interni odjel	06-10-2016	B33	OB SB	64	Urin
Urologija	14-06-2016	B34	OB SB	54	Urin
JIL	22-08-2016	B30	OB SB	45	Urin
Infektologija	04-07-2016	B18	OB SB	36	Urin
Pedijatrija	07-11-2016	B17	OB Vukovar	99	Nadzor stolica
JIL	27-09-2016	B9	OB SB	19	Hemokultura
JIL	26-09-2016	B9	OB SB	18	Hemokultura
Kirurgija	15-11-2016	B10	OB SB	20	Hemokultura
Ginekologija	17-09-2016	B11	OB SB	22	Obrisak rane
Infektologija	20-08-2016	B12	OB SB	38	Urin
Kirurgija	09-06-2016	B12	OB SB	55	Urin
JIL	05-09-2016	B13	OB SB	44	Urin
Interni odjel	22-06-2016	B14	OB SB	8	Hemokultura
Hematologija	23-03-2016	B14	OB SB	7	Hemokultura
Interni odjel	06-10-2016	B14	OB SB	6	Hemokultura
Interni odjel	04-03-2016	B14	OB SB	5	Hemokultura
Interni odjel	14-06-2016	B14	OB SB	4	Hemokultura
Infektologija	25-10-2016	B4	OB SB	31	Urin
Infektologija	21-09-2016	B4	OB SB	30	Urin
Infektologija	30-08-2016	B5	OB SB	32	Urin
Infektologija	29-08-2016	B6	OB SB	40	Urin



Slika 5.14. Dendrogramski prikaz bolničkih izolata *E. coli* ESBL

Unutar skupine izvanbolničkih izolata dendrogram je pokazao postojanje triju grupa (klastera) s pripadajućim podgrupama koje sadrže klonski visoko srodne izolate.

Klon A sadrži izolat 101 koji potječe iz urina pacijenta s područja Vukovarsko-srijemske županije i jednistven je predstavnik u toj klonskoj grupi.

Klon B sadrži izolate 85, 79, 84, 78, 76, 75, 67, 80, 90, 91, 70, 82, 83, 72, 71, 69, 88, 68, 73, 87 i 89 koji su podijeljeni u 12 podgrupa, a potječu s područja Brodsko-posavske županije. Izolati 93, 94 i 98 potječu s područja Vukovarsko-srijemske županije. Izolati 93 i 94 pokazuju klonsku srodnost s izolatima s područja Brodsko-posavske županije iz podgrupa B25 i B28 dok je izolat 98 jedinstven predstvanik podgrupe B17.

Klon D sadrži jedinstveni izolat 73 koji potječe iz urina pacijenta s područja Brodsko-posavske županije.

Izolat 88 singleton je, ali pokazuje srodnost s izolatima koji pripadaju klonu B.

Pripadnost genotipovima izvanbolničkih izolata prikazana je u Tablici 5.10.

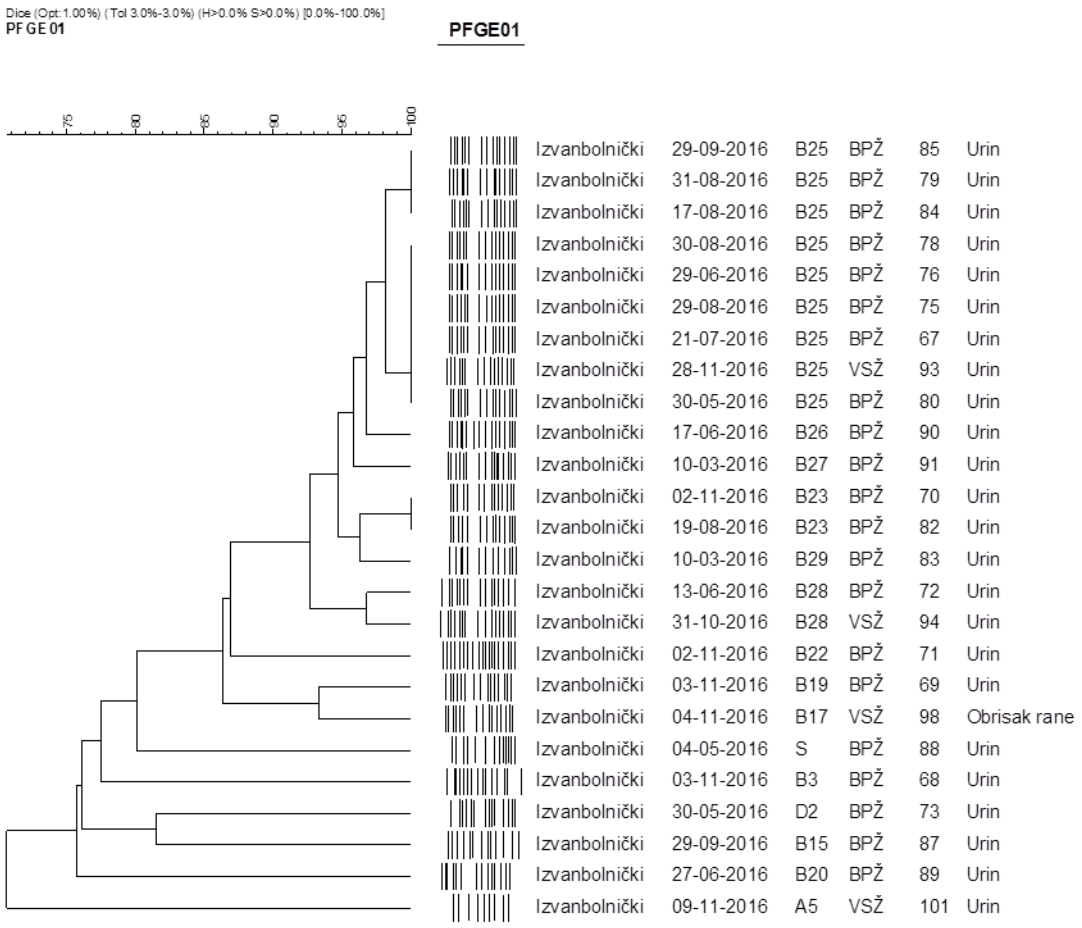
Tablica 5.10. Rezultati transkonugacije, gensko ishodište β-laktamaza, PFGE, ST, PBRT, IS – izvanbolnički izolati (N = 32)

Studjski broj izolata	Uzorak	Županija	*f* ‡ Frekvencija konjugacije	Ishodište β-laktamaza *bla*§	PFGE‖ ST¶	PBRT**	IS26††	ISEcP††
67*	Urin	BPŽ*	$1,2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B25	W, B/O	neg	neg
68*	Urin	BPŽ*	$2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B3	W, A/C, B/O	neg	neg
69*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	B19	W, A/C, B/O	neg	neg
70*	Urin	BPŽ*	$1,5x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B23 ST131	W, A/C, B/O	neg	neg
71*	Urin	BPŽ*	0	CTX-M-15	B22	X, B/O	IS26+	neg
72*	Urin	BPŽ*	0	CTX-M-1	B28	FII, B/O	IS26+	neg
73*	Urin	BPŽ*	$3,3x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	D2	W, B/O	neg	neg
74*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	NPD‡‡	W, A/C, B/O	neg	neg
75*	Urin	BPŽ*	$2,2\ x10^{-5}$	TEM-1 CTX-M-15	B25	W, A/C, B/O	neg	neg
76*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-15	B25	W, B/O	IS26+	neg
77*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	NPD‡‡	B/O	neg	neg
78*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	B25	B/O	neg	neg
79*	Urin	BPŽ*	$2,5x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B25	W, B/O	neg	neg
80*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	B25	W, B/O	IS26+	neg
81*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	NPD‡‡	W, B/O	neg	neg
82*	Urin	BPŽ*	$1,2x10^{-2}$	CTX-M-15	B23	FII, B/O	IS26+	ISEcP+
83*	Urin	BPŽ*	$1,2x10^{-2}$	CTX-M-15	B29	X, B/O	IS26+	ISEcP+
84*	Urin	BPŽ*	$2,2x10^{-4}$	CTX-M-15	B25	W, FII	neg	neg
85*	Urin	BPŽ*	$1,5x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B25	W, B/O	IS26+	neg
86*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-15	NPD‡‡	W, B/O	IS26+	ISEcP+
87*	Urin	BPŽ*	$5,2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	B15	W, A/C, B/O	IS26+	neg
88*	Urin	BPŽ*	$1,2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	S	FIC, A/C	neg	neg
89*	Urin	BPŽ*	$2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-15	B20	A/C, B/O	neg	neg
90*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	B26	W, A/C, B/O	neg	neg
91*	Urin	BPŽ*	0	TEM-1 CTX-M-1	B27	W, A/C, B/O	IS26+	neg
93†	Urin	VSŽ†	$4,2x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B25	W, A/C, B/O	neg	neg
94†	Urin	VSŽ†	$1.5x10^{-4}$	CTX-M-15	ST131 B28	FII, A/C, K/B	IS26+	neg

Studjski broj izolata	Uzorak	Županija	*f*[‡] Frekvencija konjugacije	Ishodište β-laktamaza *bla*[§]	PFGE[‖] ST[¶]	PBRT[**]	IS26[††]	ISEcP[††]
95[†]	Urin	VSŽ[†]	0	TEM-1 CTX-M-1	NPD[‡‡]	W, K/B	neg	neg
96[†]	Urin	VSŽ[†]	0	TEM-1 CTX-M-1	NPD[‡‡]	FIC, K/B	neg	neg
98[†]	Rana	VSŽ[†]	$3x10^{-4}$	TEM-1 CTX-M-1	B17	FIC, K/B	neg	neg
100[†]	Urin	VSŽ[†]	0	CTX-M-1	NPD[‡‡]	ND[§§]	ND[§§]	ND[§§]
101[†]	Urin	VSŽ[†]	$2,6x10^{-4}$	CTX-M-15	A5	X,B/O	IS26+	neg

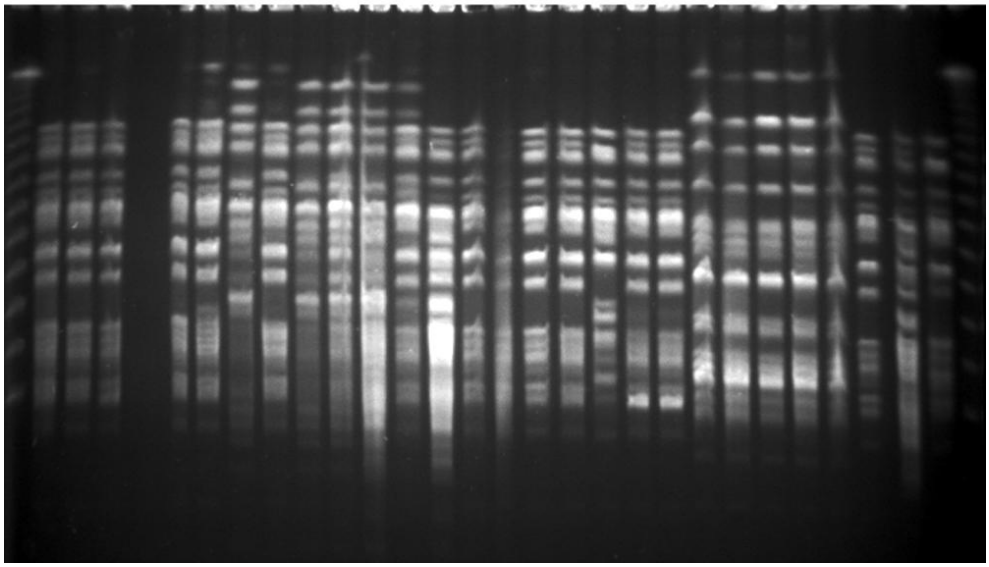
[*] Brodsko-posavska županija (BPŽ), izolati 67 – 91; [†]Vukovarsko-srijemska županija (VSŽ), izolati 93 – 96, 100 – 101; [‡]frekvencija konjugacije; [§]gensko ishodište β-laktamaza; [‖]pulsna elektroforeza u gelu; [¶]sekvencijski tip; [**] tipiziranje replikona; [††]insercijska sekvencija; [‡‡]nije prikazan u dendrogramu; [§§]nije obrađen PBRT metodom

Dendrogramski prikaz genotipizacije izvanbolničkih izolata prikazan je na Slici 5.15.



Slika 5.15. Dendrogramski prikaz izvanbolničkih izolata *E. coli* ESBL

Primjer elektroforeze PFGE produkata prikazan je na Slici 5.16.



Slika 5.16. PFGE 27 studijskih izolata *E. coli* ESBL

(Maja Tomić Paradžik, Služba za kliničku mikrobiologiju, Slavonski Brod, Hrvatska)

Raspodjela klonova, klonskih grupa i *bla* gena raspoređenih po klonskim grupama i podgrupama prikazana je u Tablici 5.11.

Tablica 5.11. Raspodjela klonskih grupa, podgrupa i *bla* gena

Klonovi	A	B	C	D	S (singleton)	Ukupno
Podgrupe	A 1 – A 5	B 1 – B 35	C 1 – C 6	D 1 – D 2		48
Izolati (N*)	8	63	15	3	4	93
$bla_{\text{CTX-M}}$†	8	63	15	3	4	93
bla_{TEM}†	1	24	13	1	3	42
bla_{OXA}†	0	3	3	1	0	7

*broj izolata; †gensko ishodište β-laktamaza

Reprezentativni izolati (5 izolata) različitih PFGE klastera primjenom MLTS metode pokazali su pripadnost ST131 klonu, što je prikazano u Tablici 5.9. i Tablici 5.10.

5.7. Osnovni klinički rezultati pacijenata s invazivnim izolatima *E. coli* (izolati iz hemokultura)

Da bismo utvrdili ima li prisutnost ESBL producirajuće *E. coli* u hemokulturama pacijenata značajniji utjecaj na ishod bolesti, statistički smo obradili njihove osnovne kliničke podatke koji su prikazani u Tablici 5.12. Statistički je značajan činitelj mortaliteta kod ove skupine pacijenata prisutnost maligne bolesti u podlozi, što je potvrđeno 2-testom ($p < 0,05$).

Tablica 5.12. Kliničke osobitosti i ishod pacijenata s *E. coli* ESBL bakterijemijom

Osobitosti pacijenata	**Svi pacijenti (N* = 20)**	**Preživjeli (N* = 16)**	**Umrli (N* = 4)**	***P*** †
Bolest bubrega	3	2	1	$p = 0,51$
Bolest jetre	7	5	2	$p = 0,59$
Intraabdominalne infekcije	5	4	1	$p > 0,99$
Maligna bolest	4	1	3	$p = 0,01$
HA-UTI‡	9	8	1	$p = 0,45$
CA-UTI§	11	11	0	
Teška sepsa ili septički šok pri bolničkome prijamu	2	1	1	$p = 0,37$
Prethodni boravak u bolnici	8	6	2	$p > 0,99$
Prethodna antimikrobna terapija	14	11	3	$p > 0,99$
Neodgovarajuća empirijska antimikrobna terapija prilikom praćenoga prijama	14	12	2	$p = 0,55$

* broj izolata; †2-test; ‡bolnički stečene infekcije mokraćnoga sustava (engl. *hospital-acquired urinary tract infection*, HA-UTI); §izvanbolnički stečene infekcije mokraćnoga sustava (engl. *community-acquired urinary tract infection*, CA-UTI)

6. RASPRAVA

Članovi porodice *Enterobacteriaceae* najčešći su i danas terapijski najproblematičniji uzročnici infekcija bolničkih i izvanbolničkih pacijenata. Vrlo su često povezani s infekcijama i epidemijama koje nastaju unutar bolničkoga sustava. *E. coli* najčešće je izolirana vrsta iz porodice enterobakterija i najčešći uzročnik infekcija izvanbolničkih pacijenata. U terapiji infekcija uzrokovanih vrstama iz porodice enterobakterija najčešći su empirijski izbor antimikrobne terapije β-laktamski antibiotici (ESC, penicilini s inhibitorima β-laktamaza) i fluorokinoloni. Učestala primjena tih skupina antibiotika uzrokuje povećanje otpornosti prema njima, ali i povećanje otpornosti na brojne druge skupine antibiotika.

Sredinom 2015. godine uočeno je povećanje broja izolata ESBL producirajuće *E. coli* kod bolničkih pacijenata Opće bolnice *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu. Pregledom podataka o izolatima izvanbolničkih pacijenata uočena je ista pojava. Dnevno praćenje izolata pokazalo je da se fenotipske karakteristike obiju skupina pacijenata uglavnom podudaraju, neovisno o ishodištu uzorka, dobi ili spolu pacijenata. Tijekom sljedeće godine povećao se broj zaprimljenih pacijenata s bakterijemijom uzrokovanom ESBL producirajućom *E. coli.* Izolati istoga fenotipa uočeni su na većini bolničkih odjela, najčešće na Odjelu za infektivne bolesti, u jedinicama intenzivnoga liječenja (JIL), na pedijatrijskim, internističkim i kirurškim odjelima. Testiranjem osjetljivosti izolata dokazana je otpornost na cefalosporine širokoga spektra, kinolone, aminoglikozide, osim amikacina, penicilinske antibiotike i amoksicilin-klavulansku kiselinu, ali uz očuvanu osjetljivost na piperacilin-tazobaktam. Slične fenotipske osobitosti izolata *E.coli* uočene su na području Vukovarsko-srijemske županije u istome periodu.

Krajem 2015. godine godine objavljeno je izvješće europskoga ogranka centra za kontrolu bolesti (ECDC) s rezultatima praćenja otpornosti bakterija na antibiotike na području Europske unije za period od 2011. do 2014. godine. U izvješću je naglašena značajna promjena u vrsti enzima β-laktamaza koje izlučuju izolati *E. coli* otporni na β-laktamske antibiotike (53). Do početka 21. stoljeća najčešće dokazani tipovi ESBL enzima pripadali su porodicama TEM, SHV i OXA. Međutim, vrlo brzo, u svega nekoliko godina, SHV i TEM β-laktamaze zamijenjene su CTX-M tipom β-laktamaza. Smatra se da je najvažniji činitelj uspješnosti širenja tih enzima pripadnost izolata *E. coli* ST131 pandemijskome klonu čija je jedna od osobitosti produkcija CTX-M-1 β-laktamaza s visokom prevalencijom CTX-M-15 podtipa enzima (23, 33, 35). Širenje CTX-M β-laktamaza u populaciji i zdravstvenim

ustanovama opisano je u brojnim europskim zemljama, npr. u Francuskoj, Poljskoj, Ujedinjenome Kraljevstvu, Španjolskoj, Portugalu, Grčkoj i Italiji, kao i u zemljama mediteranskoga kruga koje ne pripadaju Europskoj uniji, poput Turske, te u prekomorskim zemljama, u Kanadi i SAD-u. U nordijskim zemljama 20 % – 40 % ESBL producirajuće *E. coli* pripada ST131 klonu. Na području Europske unije povećanje otpornosti na ESC postepeno je, ali trajno. S 9,6 % otpornih izolata u 2011. godini otpornost na ESC dosegnula je 12 % u 2014. godini, sa značajnim razlikama u incidenciji između sjevernih i južnih europskih država (52, 53). Na području Hrvatske početkom 2000-ih praćeni su pacijenti u velikim, kliničkim centrima i pripadajuća izvanbolnička populacija te su uočene promjene u osjetljivosti i načinu širenja *E. coli* ESBL producirajućih izolata, a molekularnim su metodama dokazani CTX-M enzimi (110, 111). Predominacija CTX-M enzima u izolatima *E. coli* u Hrvatskoj uočena je u ranim 2000-im kada dolazi do prekretnice u pojavnosti vrsta β-laktamaza u kliničkim izolatima i zamjene do tada najčešće prisutnih TEM i SHV β-laktamaza CTX-M β-laktamazama (22, 112, 113). Prevalencija ESBL producirajućih izolata *E. coli* u odnosu na broj izolata osjetljive *E. coli* na području Brodsko-posavske županije povećala se u svim vrstama uzoraka s 1 % u 2012. godini na 22 % u 2016. godini, što je znatno više od prijavljene stope za Hrvatsku koja iznosi 4 % u 2016. godini (3). Ova je studija dokazala značajne epidemiološke promjene u širenju otpornih izolata *E. coli* unutar zdravstvenih ustanova i u izvanbolničkoj populaciji.

Epidemiologija CTX-M *E. coli* pokazuje šaroliku distribuciju na području europskih zemalja, pa iako je *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ najdominantinij genotip, postoje lokalne različitosti. Na području nordijskih zemalja, Švedske, Norveške, Danske i Finske, rasprostranjen je *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genotip u oko 80 % izolata, dok je kod 20 % izolata dokazan *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ genotip. Na području Španjolske, kako je već prethodno navedeno, prevladavaju *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ i *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ dok u Portugalu, kao i pojedinim zemljama Istočne Europe, dominira *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$ genotip. Na području Afrike, većega dijela Azije te Sjeverne Amerike dominira *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genotip. Na području jugozapadne Azije također postoje razlike u distribuciji genotipova te je na području Japana najčešći *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ genotip, na području Kine *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ genotip, slično kao u Španjolskoj, a na području Indije prevladava, kao i na našemu studijskome području, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genotip. Na području Južne Amerike široko je rasprostranjena CTX-M-2 filogenetska grupa uz rijetku, ali ipak prisutnu, CTX-M-8 filogrupu. Prijenos *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena može nastupiti tijekom razvoja novih bakterijskih klonova ili horizontalnim prijenosom gena putem plazmida. Horizontalnim prijenosom gena plazmidi nositelji šire se između istih, ali i između različitih,

bakterijskih vrsta (54, 77, 114). Crijevni mikrobiom predstavlja idealan rezervoar gena otpornosti budući da se unutar crijevnoga sadržaja neprekidno odvijaju interakcije između prisutnih bakterijskih vrsta i imunološkog sustava. Pritisak antimikrobnih spojeva probire (selekcionira) otporne generacije bakterija, što dovodi do akumulacije gena potrebnih za preživljavanje u novonastalim uvjetima. Takvi plazmidi horizontalnim širenjem prenose višestruke gene otpornosti na brojne antibiotike čime se može objasniti prisutnost višestruke otpornosti (engl. *multi-drug-resistant*, MDR.) kod ESBL producirajućih izolata (115).

U prethodnim je desetljećima postojala jasnije izražena granica u pojavnosti otpornih patogena i pojedinih bakterijskih vrsta između zdravstvenih ustanova i društva. Danas uočavamo gubitak jasnih granica između bolničkih i izvanbolničkih bakterijskih vrsta, što otežava definiranje infekcije kao bolnički stečene ili donesene iz zajednice, a što se jako dobro uočava upravo u širenju ESBL CTX-M producirajuće *E. coli* (115).

Unatoč zamjeni TEM i SHV β-laktamaza CTX-M tipom β-laktamaza u prvome desetljeću 21. stoljeća provedeno istraživanje na izolatima sa studijskoga područja pokazalo je još uvijek značajnu prisutnost TEM-1 β-laktamaze koja je jednakomjerno prisutna u izolatima bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, kao što je prikazano u Tablicama 5.9. i 5.10. Istovremena prisutnost bla_{TEM} i $bla_{\text{CTX-M}}$ gena dokazana je u izolatima obiju skupina pacijenata, a bla_{SHV} gen nije dokazan ni u jednome izolatu. Ti rezultati potvrđuju pretpostavku o značajnim promjenama epidemioloških i molekularnih osobitosti ESBL producirajuće *E. coli*. U prethodnim godinama CTX-M producirajući izolati *E. coli* uglavnom su registrirani u urinu i(li) krvi izvanbolničkih pacijenata, dok danas izazivaju infekcije kod hospitaliziranih bolesnika bez dokazanoga ishodišta u prethodno spomenutim uzorcima. Najznačajniji razlog takve promjene u širenju ESBL producirajućih izolata *E. coli* širenje je izuzetno potentnoga ST131 klona koji iskazuje svojstvo globalne diseminacije i sposobnost brze kolonizacije (71, 78, 116). Osim ESBL izolata *E. coli* klon ST131 obuhvaća i ne-ESBL izolate *E. coli*, što ga čini jednim od najčešće registriranih klonova na svjetskoj razini. Članovi klona, zahvaljujući širokoj rasprostranjenosti u populaciji, izazivaju raznovrsne infekcije, a posljedični antimikrobni pritisak dovodi do probira otpornoga bla_{ESBL} gena koji se uspješno šire u okoliš. Unatoč činjenici da najveći dio ESBL producirajućih izolata *E. coli* pripada ST131 klonu, objavljene studije pokazale su da je ipak najveći dio takvih izolata genski nepovezan (117, 118). Ta saznanja upućuju na horizontalno širenje kao glavni put rasapa bla_{ESBL} gena i ukazuju na njihovu sposobnost prijenosa na novonastale jedinke *E. coli* brojnim glavnim i alternativnim putovima (115).

Rezultati ove studije potvrdili su pretpostavku o gubitku jasne granice između bolnički stečene infekcije i izvanbolničke infekcije prema važećim CDC mjerilima, što se može uočiti na podatcima dobivenim rasčlambom studijskih izolata iz hemokultura (115). Jedanaest (55 %) od ukupno dvadeset izolata iz hemokultura prikupljeno je od pacijenta odmah po bolničkome prijamu, a uzorci krvi za devet izolata (45 %) tijekom sljedeća 72 sata od prijama. Retrogradnom analizom medicinskih podataka uočeno je da su pacijenti iz druge skupine boravili u bolnici i primali antimikrobnu terapiju unutar prethodna tri mjeseca. Pacijenti iz prve skupine nisu boravili u bolnici u navedenome periodu, ali je njih 7 (35 %) izvanbolnički koristilo antimikrobnu terapiju zbog raznovrsnih indikacija. Od ukupno dvadeset pacijenata s pozitivnim hemokulturama iz ove studije, četrnaest (70 %) pacijenata primalo je antimikrobnu terapiju tijekom prethodna tri mjeseca. Ti podatci ukazuju na to da je prethodna primjena antibiotika značajan rizični činitelj za kolonizaciju ESBL producirajućim izolatima što su pokazala i prethodno provedena istraživanja (117, 118). Uobičajeni rizici stjecanja infekcije i(li) kolonizacije takvim sojem uključuju boravak pacijenta u domovima za starije i nemoćne, produženi boravak u bolnici, boravak u JIL-u, prisutnost urinarnoga katetera, prethodno uzimanje antibiotika, prisutnost drugih bolesti ili stanja, poput dijabetesa, intraabdominalnih infekcija, bolesti jetre ili malignih bolesti (62, 117, 118). Daljnjom rasčlambom podataka pacijenata s bakterijemijom pokazalo se da značajan utjecaj na njihovu smrtnost ima samo prisutnost maligne bolesti u podlozi (p = 0,01). Ostale bolesti u podlozi, poput otkazivanja jetre i(li) bubrega, kliničko stanje pacijenta po prijamu, kao i neodgovarajuća empirijska terapija, nemaju značajniji utjecaj na mortalitet pacijenata, što potvrđuju i rezultati srodnih studija. Prethodna primjena antibiotika osnovni je činitelj kolonizacije otpornim bakterijskim izolatima (117, 118). Kliničke karakteristike, rizični činitelji i ishod pacijenata sa sepsom uzrokovanom ESBL *E. coli* prikazani su Tablici 5.12.

Činjenica da je *E. coli* najčešći uzročnik urinarnih infekcija odražava se i na ishodištu studijskih izolata koji uglavnom potječu iz urina bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, kao što je prikazano u Tablici 5.2. i na Slici 5.3. Raspodjela pacijenata prema spolu jednaka je u svim dobnim skupinama, osim dobne skupine od 1 godine do 18 godina, gdje je veći broj žena, što je prikazano na Slici 5.2. U skupini pacijenata s invazivnim izolatima iz hemokultura spolna razdioba nije statistički značajna jer je 10 pacijenata ženskoga i 10 muškoga spola. Vrlo mali broj uzoraka (N = 9) potječe iz drugih anatomskih područja poput obrisaka rana, sadržaja abdominalnoga drena, stolice i nadzornoga obriska kože. Iz te skupine uzoraka samo jedan potječe od izvanbolničkoga pacijenta. Prisutnost CTX-M ESBL *E. coli* na bolničkim odjelima

i u različitim vrstama bioloških uzoraka ukazuje na sposobnost brzoga širenja i kolonizacije brojnih anatomskih područja ovakvim izolatima koji su u prethodnome desetljeću uglavnom imali ishodište u urinu izvanbolničkih pacijenata (62, 65, 119).

Izvanbolnički izolati CTX-M ESBL producirajuće *E. coli* ulaskom u bolnički okoliš i uz prisutnost selektivnoga djelovanja antibiotika prerastaju fiziološku floru i prenose gene otpornosti na nove generacije mikroorganizama u čemu plazmidi imaju značajnu ulogu. Neracionalna primjena antibiotika u bolničkome okruženju, izvanbolničkome sustavu zdravstvene zaštite i društvu općenito dovodi do probira i posljedično lakšega širenja otpornih mikroorganizama, poput ESBL producirajućih enterobakterija, klostridija (*C. difficile*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* te različitih vrsta kvasaca, najčešće vrste *Candida*. Ti otporni mikroorganizmi koloniziraju *prazna* područja koja su prije upotrebe antibiotika bila nastanjena fiziološkom florom. Prisutnost takvih mikoorganizama na relativno ograničenome prostoru pribavlja veliku količinu malih i vrlo pokretnih ekstrakromosomskih genskih elemenata, poput plazmida i transpozona koji nose raznovrsne gene odgovorne za antimikrobnu otpornost (120, 121, 122). Primjenom PBRT metode (*Inc/rep typing*) u obradi studijskih izolata dokazana je prisutnost velikoga broja plazmida različitih inkompatibilnih grupa. Ta metoda koristi setove početnica koje ciljno djeluju na različitim mjestima genoma, poput *rep* gena, iterona, RNAI, specifičnih za pojedine plazmidne grupe (102, 107).

Danas razlikujemo 23 inkompatibilne grupe plazmida, i to B, C, D, E, FI, FII, FIV, H, Iα, I_2, Iγ, I_δ, I_ζ, J, K, M, N, P, T, V, W i X (121). Najveći broj dokazanih plazmida u studijskim izolatima pripada inkompatiblinim grupama IncB/O, IncW i IncA/C dok su plazmidi drugih grupa, poput IncX, IncFII, IncL i IncK/B, zastupljeni u manjemu broju. U prijašnjim studijama najčešće dokazana plazmidna grupa odgovorna za kodiranje CTX-M-15 β-laktamaza na području Azije i obiju Amerika bila je IncF grupa. Na području Europe IncF grupa također je prisutna u kliničkim izolatima, ali ne toliko često kao na području Azije i Amerike. Europski izolati iskazuju veliku šarolikost plazmidnih grupa bez obzira na to radi li se o uzorcima ljudskoga ili životinjskoga podrijetla (81, 120, 121). IncF grupa (FI, FII, FIA, FIB, FIC, FIV) rasprostranjena je između članova porodice enterobakterija, nosi višestruke gene otpornosti i najčešće je opisana plazmidna grupa u izolatima ljudskoga i životinjskoga podrijetla. Geni otpornosti dokazani na IncF plazmidu geni su koji kodiraju ESBL, karbapenemaze, aminoglikozidaze i plazmidski posredovanu otpornost na kinolone. Širenje $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gena unutar ljudske populacije povezano je s prisutnošću IncFII plazmida u ST131 i ST405 klonovima. IncF grupa u manjemu je broju prisutna u studijskim izolatima, što se

može objasniti istovremenom prisutnošću *bla*TEM gena u izolatima i većoj učestalosti IncI plazmidne grupe (102, 107, 121).

Uz IncF IncI plazmidni skup (kompleks) čini značajan udio među plazmidnim grupama dokazanim u izolatima europskih pacijenata. IncI naprisutniji je plazmidni skup u izolatima životinjskoga porijekla i u izolatima iz okoliša s europskoga područja. Gen $bla_{\text{CTX-M-1}}$ najčešće je dokazan gen na IncI plazmidu i povezan s *E. coli* ST131 klonom. IncI skup sadrži Inc grupe I, K, B i Z. IncI plazmidi koji nose $bla_{\text{CTX-M-1}}$ dokazani su iz uzoraka peradi diljem Europe te mogu biti izvor plazmidno genskih kombinacija u izolatima *E. coli* ljudskoga ishodišta. IncB/O plazmidna grupa, najčešće dokazana grupa plazmida u ovoj studiji, može pokazivati križnu reakciju s IncK grupom tijekom izvođnja testa te su takvi plazmidi najčešće definirani kao IncK/B grupa uslijed nemogućnosti razlikovanja IncB/O i IncK replikona. IncB/O plazmidi nose brojne i raznovrsne gene otpornosti, poput $bla_{\text{CTX-M-1}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$, $bla_{\text{CMY-2}}$, $bla_{\text{ACC-4}}$ i brojne druge.

IncW plazmidna grupa pripada široko rasprostranjenoj grupi plazmida, a zbog veličine od 40 kb ubraja se u najmanje konjugativne plazmide. IncW plazmidi nose gene otpornosti za kloramfenikol, tetracikline, sulfonamide, gentamicin i trimetroprim. Također posjeduju gene za kodiranje karbapenemaza, $bla_{\text{KPC-2}}$ i metalo-β-laktamaza, bla_{VIM}. IncA/C plazmidna grupa danas je podijeljena na 12 sekvencijskih tipova dokazanih MLTS metodom i najčešće je povezana s MDR izolatima. Široko je rasprostranjena diljem svijeta, dokazana u izolatima ljudskoga i životinjskoga podrijetla, ali ne i u izolatima iz okoliša. U europskim zemljama uglavnom je prisutna u izolatima ljudskoga podrijetla. Kodira bla_{CMY}, bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{OXA}, bla_{NDM} te brojne druge enzime za raznovrsne grupe antibiotika, poput IncW plazmida. IncX plazmidna gupa dokazana je u izolatima *Salmonella* i *E. coli* ljudskoga i životinjskoga podrijetla te uglavnom nosi gene otpornosti prema β-laktamskim antibioticima širokoga spektra, tetraciklinima i trimetoprimu, a dokazano je nosilaštvo bla_{KPC} i bla_{NDM} gena (121, 122). Plazmidi koji nose $bla_{\text{CTX-M}}$ gene pokazuju izuzetnu sposobnost samokonjugacije i obično nose dodatne činitelje otpornosti, što uvelike olakšava široku raspodjelu alela u različitim okruženjima. Unatoč raznovrsnim $bla_{\text{CTX-M}}$ genima *E. coli* otkrivenih tijekom zadnjega desetljeća $bla_{\text{CTX-M-15}}$ i $bla_{\text{CTX-M-14}}$ geni još su uvijek najčešće prisutni u populaciji. Dokazani su u ljudskim izolatima, životinjskim izolatima i u izolatima iz okoliša, a prema klonskoj pripadnosti najčešće su članovi klona ST131, poput studijskih izolata ili klona ST405 (123, 124, 125).

Osim *bla*$_{\text{ESBL}}$ gena i plazmida koji kodiraju proizvodnju enzima kod izolata s vrijednostima MIK-a za ertapenem od 1mg/L dokazana je prisutnost IncL plazmida čija prisutnost upućuje na postojanje otpornosti na karbapeneme (108, 121). Otpornost studijskih izolata na karbapeneme dokazana je tek primjenom mikrodilucije u bujonu. Razlog je poznata slaba hidrolitička aktivnost OXA-48 enzima koja se teže ispoljava tijekom testiranja osjetljivosti na krutim podlogama. Slične osobitosti uočene su kod testiranja osjetljivosti izolata disk-difuzijskom metodom na amoksicilin-klavulansku kiselinu usporedbom s rezultatima dobivenim mikrodilucijom u bujonu. ESBL izolati nisu inhibirani klavulanskom kiselinom, ali se to svojstvo bolje očituje tijekom testiranja u tekućemu mediju (25, 32, 46). U 10 testiranih izolata od ukupno 25 s vrijednostima MIK-a za ertapenem od 1,0 mg/L dokazana je prisutnost *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena, IncL plazmida i insercijske sekvence Tn*1999.* Ti rezultati upućuju na prisutnu karbapenemsku otpornost izolata koji su disk-difuzijskom metodom testiranja iskazali dobru osjetljivost na sve antibiotike te skupine. S obzirom na to da je tijekom 2016. godine na području cijele Hrvatske, pa tako i na području Brodsko-posavske županije, dokazano epidemijsko širenje OXA-48 producirajućih izolata *K. pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*, ti rezultati ukazuju na to da su isti genski markeri, nositelji otpornosti na karbapeneme, prisutni i u izolatima drugih članova porodice enterobakterija, pa tako i u *E. coli* (126, 120). Iako je *bla*$_{\text{OXA-48}}$ dokazan na IncF i IncP plazmidima, svjetska disemnacija *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena dogodila se insercijom transpozoma transpozona Tn*1999* u *tir* gen IncL plazmida odgovornoga za aktiviranje inhibitora konjugacije, što se smatra glavnim činiteljem uspješnosti širenja toga plazmida. Osim *bla*$_{\text{OXA-48}}$ IncL plazmid nosi *bla*$_{\text{CTX-M-1, -3, -14, -15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1, -10, -52}}$, *bla*$_{\text{SHV-1}}$ i *armA* gene. U ovoj studiji utvrđena je prisutnost brojnih plazmida nositelja raznovrsnih gena otpornosti. Pojedini plazmidi prisutni u studijskim izolatima pokazali su jaku povezanost sa specifičnim genom, poput IncL plazmida s *bla*$_{\text{OXA-48}}$ i IncI plazmida s *bla*$_{\text{ESBL}}$ genom, što je dokazano i u prethodnim studijama (121, 122, 127, 128).

Insercijske sekvencije IS*26* i IS*Ecp* dokazane u studijskim izolatima imaju značajnu uloga u mobilizaciji i ekspresiji *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena (35, 128, 129). Prema prethodno publiciranim istraživanjima prisutnost IS*26* sekvencije na konjugativnim bakterijskim elementima poput plazmida pospješuje njihovo širenje između gram-negativnih mikroorganizama. Ta sekvencija koristan je molekularni marker koji pruža dodatne informacije kod utvrđivanja pripadnosti određenome klonu tijekom epidemije. IS*Ecp* sekvencija odgovorna je za povećanu pokretljivost transpozona i za povećanu pokretljivosti i uspješno širenje *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena između mikroorganizama. Svojm prisustvom olakšava preuzimanje i mobilizaciju cijeloga niza gena

nositelja otpornosti na antibiotike, što posljedično dovodi do većega ispoljavanja otpornosti u *E. coli* i *K. pneumoniae,* ali i do većega ispoljavanja otpornosti među svim ostalim članovima porodice *Enterobacteriaceae* (129, 130). Nismo bili u mogućnosti dokazati prisutnost ISCR1 i fagima posredovane sekvencije za koje je također dokazano da utječu na pokretljivost i širenje gena (35, 124). Prisutnost insercijskih sekvencija u studijskim izolatima prikazana je u Tablici 5.9. i Tablici 5.10. Pokretni genski elementi – plazmidi, transpozoni i insercijske sekvencije, uslijed djelovanja antimikrobnoga pritiska tijekom uzimanja antibiotika opstaju u otpornim bakterijskim klonovima koji nakon selekcije koloniziraju raznovrsna anatomska područja, ponajprije probavni sustav (123).

Kolonizacija ljudi CTX-M pozitivnim izolatima ESBL producirajuće *E. coli* nije samo posljedica primjene antibiotika u medicinske svrhe već i rezultat korištenja mesa zdravih životinja koloniziranih tim klonom. Novije publicirane studije opisale su prisutnost CTX-M producirajuće *E. coli* u prehrambenim proizvodima životinjskoga podrijetla, u uzorcima iz probavnoga trakta kućnih ljubimaca, divljih ptica i životinja iz uzgoja. Kolonizacija probavnoga sustava uzgojnih životinja i sekundarna kontaminacija mesa u maloprodaji vjerojatno imaju ulogu u učestaloj prisutnosti takvih izolata u ljudskoj populaciji (129). Studija provedena u Nizozemskoj ukazala je na visoku prevalenciju takvih izolata u izmetu peradi, mesu i drugim proizvodima dobivenim od peradi, kao i u ljudskim uzorcima, što je najvjerojatnije posljedica izmjenjivanja gena i ostalih pokretnih genskih elemenata među različitim nositeljima u lancu ishrane (124).

Usporedbom genskih PFGE profila izolati ESBL producirajuće *E. coli* svrstani su u 4 dominantne klonske grupe, A, B, C i D s 48 podgrupa. U klon A svrstane su podgrupe od A1 do A5 i obuhvaćaju 8 (8,6 %) izolata. Klon B najveća je klonska grupa u koju su svrstane podgrupe od B1 do B35 i obuhvaćaju 63 (67,7 %) izolata. Klon C sadrži podgrupe od C1 do C6 i obuhvaća 15 (16,1 %) izolata. Klon D sadrži podgrupe D1 i D2 s 3 (3,2 %) izolata.

Bolnički izolati raspoređeni u četiri klonske grupe prikazani su na Slici 5.14. Izolati 31 i 30 podgrupe B4 koji potječu s odjela infektologije identični su i najvjerojatnije preneseni rukama zdravstvenoga osoblja ili su endemski prisutni na odjelnim površinama. Izolati 8, 7, 6, 5 i 4 podgrupe B14 koji potječu s internoga odjela identični su, a zabrinjavajuć je podatak da su svi izolirani iz hemokultura pacijenata. Budući da su izolirani u različitome periodu, upućuju na epidemijski prijenos rukama zdravstvenoga osoblja i(li) putem odjelnih površina ili predmeta. Izolati 3, 9, 10, 12, 13 i 15 potječu iz hemokultura pacijenata s različitih bolničkih odjela u

Slavonskome Brodu. Izolirani su u različitome periodu, ali imaju identični raspored nukleotida, što upućuje na križni prijenos između različitih odjela najvjerojatnije rukama zdravstvenih radnika.

Grupiranje studijskih izolata u četiri klona identificirana u kratkome razdoblju može ukazivati na endemsku prisutnost CTX-M ESBL producirajuće *E. coli* u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu. Takvi rezultati također mogu značiti dugotrajnu i neprepoznatu prisutnost na pojedinim bolničkim odjelima, poput kirurških odjela ili odjela intenzivne skrbi. Visoko srodni izolati dobiveni s različitih bolničkih odjela mogu ukazivati i na križne infekcije, što nije neobično s obzirom na česte premještaje pacijenata s visoko rizičnih odjela, poput JIL-a, na kirurške odjele, internističke odjele ili na Odjel za zarazne bolesti.

Izvanbolnički izolati raspoređeni u 3 klonske grupe prikazani su na na Slici 5.15. Najveći broj izvanbolničkih izolata prikazanih u dendrogramu svrstan je u grupu B, podgrupu B25, u kojoj se nalaze izolati s područja Brodsko-posavske i Vukovarsko-srijemske županije. Grupa B28 također sadrži izolate s područja obiju županija. Ostali prikazani izvanbolnički izolati svrstani su u jedinstvene podgrupe ovisno o zemljopisnome području.

Unutar klonskih grupa nalaze se srodni izolati iz različitih bolnica koji pripadaju različitim podgrupama u kojima su jedinstveni izolati. Takav je primjer izolat studijskoga broja 102 koji potječe iz hemokulture pacijenta s kirurškoga odjela vukovarske bolnice i koji je svrstan u klonsku grupu A, podgrupu A2 kao jedinstveni klon. Isti primjer možemo uočiti i na izvanbolničkim izolatima. Tako se unutar grupe A nalazi izolat 101 koji potječe iz urina izvanbolničkoga pacijenta s područja Vukovarsko-srijemske županije i jedinstveni je pripadnik podgrupe A5. Iako su pojedini izolati dobiveni od pacijenata iz različitih bolnica i s različitih zemljopisnih područja iskazali pripadnost istim klonskim grupama i ponekim podgrupama, ipak možemo zaključiti da su bolnički i izvanbolnički izolati klonski povezani unutar istoga zemljopisnoga područja. Rezultati PFGE tipizacije pokazuju da postoji visoka klonska srodnost i između bolničkih i izvanbolničkih izolata, što potvrđuje pretpostavku o gubitku jasne granice između tih dviju skupina pacijenata. Kolonizirani izvanbolnički pacijenti vjerojatno su ishodište bolničkih CTX-M pozitivnih izolata ESBL producirajuće *E. coli.*

Usljed rastuće otpornosti na cefalosporine treće generacije primjena cefalosporina četvrte generacije u terapiji ESBL infekcija ima opravdanje u slučajevima kada prevladavaju SHV ili

TEM tipovi β-laktamaza. Kod infekcija uzrokovanih CTX-M lučiteljima, cefepim nije dobar izbor budući da je podložan hidrolitičkoj aktivnosti tih enzima (87, 90). Svojstvo izlučivanja CTX-M β-laktamaza povezano je s otpornošću takvoga izolata i na ne-β-laktamske antibiotike, poput fluorokinolona, aminoglikozida, sulfonamida i tetraciklina, što se može objasniti činjenicom da plazmidi koji kodiraju stvaranje β-laktamaza često nose dodatne gene za ne-β-laktamske antibiotike (62). Testiranje osjetljivosti studijskih izolata pokazalo je visoke vrijednosti prijelomnih točaka za sve ESC, amoksicilin-klavulansku kiselinu, florokinolone i gentmicin, što je prikazano u Tablici 5.5. i Tablici 5.6. Rezultati testiranja pokazali su da nema značajnije razlike u osjetljivosti bolničkih i izvanbolničkih izolata na cefalosporine proširenoga spektra. Nešto bolja osjetljivost izvanbolničkih izolata na amoksicilin-klavulansku kiselinu, cefepim i gentamicin nije potvrđena mikrodilucijom u bujonu, a jedina značajna razlika uočena je tijekom testiranja piperacilin-tazobaktama. Disk-difuzijskom metodom prevalencija otpornih izolata bila je podjednaka u objema skupinama, međutim rezultat mikrodilucije u bujonu pokazao je na značajno višu otpornost izvanbolničkih izolata od čak 81 % dok je u skupini bolničkih izolata ona iznosila svega 20 %. Takav je rezultat najvjerojatnije posljedica neodgovarajuće gustoće inokuluma tijekom disk-difuzijskoga testiranja, ali i veće primjene penicilina s inhibitorima, poput amoksicilin-klavulanske kiseline, u izvanbolničkoj populaciji. Visoka otpornost na brojne skupine antibiotika smanjuje terapijske mogućnosti, pa u slučajevima teških infekcija, kao najbolji terapijski izbor, preostaju karbapenemi. Povećana potrošnja karbapenema dovodi do razvoja otpornosti na te antibiotike i značajno je prisutna u zemljama mediteranskoga pojasa i ostalim zemljama Europske unije kod kojih je prethodno uočena visoka prevalencija ESBL izolata. S istim problemom suočile su se zemlje Dalekog istoka, Indija i države Sjeverne Amerike gdje je velika potrošnja karbapenema dovela do širenja karbapenem-rezistentnih izolata enterobakterija (engl. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*, CRE ili *carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*, CPE) već krajem 20. stoljeća, a koji su se na području Hrvatske pojavili početkom ovoga desetljeća (131, 132). Povećanje potrošnje karbapenemskih antibiotika uočeno je praćenjem potrošnje antibiotika u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu od 2012. godine do 2016. godine, što je prikazano u Tablici 5.3. Značajan porast uočen je u potrošnji ertapenema koja se sa 620 DDD u 2012. godini povećala na 1208 DDD u 2016. godini te porast potrošnje meropenema sa 121 DDD na 281 DDD u istome periodu. Na području Brodsko-posavske županije koje gravitira mikrobiološkome laboratoriju u Slavonskome Brodu u 2016. godini dokazani su karbapenem-rezistentni izolati unutar vrsta *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* (126). Brzina

stjecanja (ili preuzimanja) novih gena povećava se na područjima pod selektivnim antimikrobnim pritiskom, pri čemu transpozoni omogućuju višestruki prijenos gena na plazmide ili kromosome. Uslijed uništenja osjetljivih populacija mikroorganizama tijekom antimikrobne terapije primjena pojedinih antibiotika dovodi do probira točno određenih tipova otpornosti (88, 89).

Kontrola širenja ESBL producirajućih enterobakterija izuzetno je zahtjevna jer pojedini mikroorganizmi niske virulencije, ali visoke otpornosti, mogu biti široko rasprostranjeni u bolničkome okolišu znatno prije nego što je njihova prisutnost utvrđena kod pacijenta. Neprovođenje postupaka u svrhu sprječavanja prijenosa i probira otpornih klonova i nepoznavanje svih mehanizama prijenosa otpornosti onemogućuje uspostavljanje kontroliranoga zdravstvenoga okruženja za osjetljivu populaciju pacijenata. Racionalna antimikrobna politika u zdravstvenoj ustanovi, primjena snopova postupaka u svrhu kontrole i sprječavanja bolničkih infekcija, obuzdavanja širenja otpornih klonova tijekom epidemije, nadzor nad kolonizacijom pacijenata i osoblja te dostupnost modernih laboratorijskih tehnika u brzome otkrivanju specifičnih otpornosti mikroorganizama činitelji su koji poboljšavaju kvalitetu zdravstvene usluge i standard zdravstvene ustanove. Zadovoljavajući ishod liječenja pacijenata s teškim, životnougrožavajućim infekcijama između ostalog ovisi i o ranoj primjeni odgovarajuće antimikrobne terapije. Standardni dijagnostički mikrobiološki postupci ipak zahtijevaju određeni period za izvršenje te se vrlo često mora primijeniti empirijska terapija koja može (ali i ne mora) biti odgovarajuća za dokazani uzročnik infekcije. Loša procjena stanja pacijenta i primjena nedjelotvornoga antibiotika u slučaju bakterijemije i(li) sepse može dovesti do smrtnoga ishoda liječenja (133).

Utjecaj na uspješnost terapije imaju vrsta ESBL enzima, tip mutacije i sam supstrat (antibiotik). MIK-ovi oksimino-β-laktama, poput ceftriaksona, koji je često prvi antibiotik empirijske terapije kod izvanbolničke bakterijemije ili sepse, veći su kod ESBL lučitelja s mutacijama Arg164Ser, Asp179Gly ili Gly238Ser. Ista mutacija utječe na povećanje MIK-ova ceftazidima u odnosu na MIK cefotaksima. Ponekad samo jedna mutacija, poput Ala237Thr, može četverostruko povećati hidrolitičku aktivnost prema cefalosporinima i istovremeno smanjiti aktivnost prema penicilinskim spojevima. Takva vrsta mutacije opisuje se kao modulirajuća aktivnost prema pojedinim supstratima i može bakterijskome soju pružiti selektivnu prednost u kliničkome okruženju. Način na koji bakterije pospješuju otpornost prema antibioticima je preuzimanje (akvizicija) druge vrste mehanizama otpornosti, najčešće smanjenjem propusnosti vanjske membrane. Drugi je način povećanje ekspresije

promotorskih gena mutacijma i(li) zamjenama, umetanjem insercijskih sekvencija ili umnožavanjem kopija ESBL gena (15). Evolucija ESBL ezima putem mutacija prisutna je u TEM SHV i CTX-M porodicama β-laktamaza, no među članovima CTX-M porodice registrirani su brojni primjeri aktivnih prilagodbi i modifikacija enzima uslijed zamjena amino grupa. Zahvaljujući intrinzički prisutnoj ESBL aktivnosti CTX-M producirajućih enterobakterija, koja potječe od njihova prirodnoga nositelja iz roda *Kluyvera*, *bla*$_{\text{CTX-M}}$ geni najvjerojatnije su nastali kroz niz mobilizacijskih događaja. Takav genski bazen prošao je brojne evolucijske promjene koje su se u početku odvijale unutar samoga roda *Kluyvera* te su se nastavile nakon mobilizacije genskoga materijala (23). Prva stepenica toga procesa dovela je do razdvajanja CTX-M porodice β-laktamaza na 5 potporodica, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25, koje unutar grupe pokazuju srodnost nešto manju od 90 %. Druga stepenica predstavlja mikroevoluciju unutar potporodica uslijed koje je nastalo više od 60 inačica enzima sa srodnošću većom od 94 %. Izuzetno brza mikroevolucija unutar grupe CTX-M β-laktamaza tijekom protekla dva desetljeća teško je objašnjiva, ali predstavlja izuzetan epidemiološki uspjeh. Kristalografske studije pokazale su da se volumen aktivnoga mjesta CTX-M enzima ne povećava tijekom mutacija, što se događa tijekom istoga procesa kod TEM i SHV β-laktamaza. Aktivnost CTX-M enzima prema oksimino-β-laktamskim supstratima najvjerojatnije ovisi o specifičnim interakcijama s bočnim lancima putem Ser237 i Asn104 (15, 23). Supstratna preferencija CTX-M enzima prema cefotaksimu i ceftriaksonu te zanemariva aktivnost prema ceftazidimu bile su prve razlikovne osobitosti u odnosu na članove TEM i SHV porodica. Međutim, izuzetno brzo dolazi do povećanja hidrolitičke aktivnosti CTX-M klonova prema ceftazidimu, i to zahvaljujući mutacijama na samo dvama amino-acidnim mjestima. Takve mutacije prethodno su dokazane u enzimima iz prirodnoga okoliša i u laboratorijski potpomognutim uvjetima. Među prirodnim varijantama CTX-M enzima zamjena Asp240 glicinom (Asp240/Gly) karakteristika je CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-25, CTX-M-27 i CTX-M-32 koja utječe na povećanje hidrolitičke aktivnosti prema ceftazidimu (23). Prisutnost tih mutacija najvjerojatnije je razlog visoke hidrolitičke aktivnosti prema ceftriaksonu, cefotaksimu i ceftazidimu kod studijskih izolata i posljedično visokih vrijednosti MIK-a, kao što je prikazano u Tablici 5.5. i Tablici 5.6.

Brze mutacije amino-acidnih mjesta i posljedična otpornost na ESC, uz istovremenu prisutnost *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena koji predstavlja dodatno gensko opterećenje, čine upitnim terapijsku djelotvornost karbapenema. Prisutnost IncI i IncX plazmida u studijskim izolatima zabrinjavajuć je podatak budući da novije publicirane studije ukazuju na povezanost tih

plazmida s *mcr*-1 genom, nositeljem otpornosti na kolistin koji je posljednja terapijska mogućnost u liječenju infekcija uzrokovanih s karbapenem-rezistentnim enterobakterijama. Kolistin se široko koristi u veterinarskoj medicini za liječenje gram-negativnih infekcija i kao promotor rasta u uzgoju svinja i peradi. Prijenos otpornosti na kolistin zbiva se među uzgojnim životinjama preko hranidbenoga lanca, a kolonizacija čovjeka može se dogoditi hranom, direktnim kontaktom i zagađenom pitkom ili morskom vodom. S obzirom na to da *mcr*-1 pozitivni izolati istovremeno nose i $bla_{\text{CTX-M}}$ gene, moguća su raznovrsna pregrupiranja aminokiselina, zamjene ciljnih mjesta, unos insercijskih sekvencija, transpozoma i ostalih pokretnih genskih elemenata koji svojom prisutnošću dovode do brojnih rekombinacija unutar iste vrste ili međuvrsno, što vrlo često vodi do pojave novih oblika otpornosti (134, 135).

Otpornost enterobakterija na karbapeneme u značajanome je porastu zahvaljujući svjetskoj diseminaciji $bla_{\text{OXA-48}}$ gena prvotno dokazanoga u zemljama s visokom prevalencijom ESBL izolata i posljedičnoj povećanoj primjeni karbapenema. Prvi izolati OXA-48 opisani su u Turskoj 2004. godine kod izolata *K. pneumoniae*, a nešto kasnije i kod izolata *Enterobacter cloacae* i *E. coli*. U sljedećih desetak godina OXA-48 izolati opisani su u brojnim europskim zemljama, poput Njemačke, Francuske, Portugala i Rumunjske, te u zemljama Dalekoga istoka. Najveći broj prijavljenih OXA-48 izolata i dalje potječe iz Turske gdje takvi izolati čine više od 90 % svih karbapenem-rezistentnih izolata (136 – 141). Prvi OXA-48 pozitivni izolati *K. pneumoniae* i *Enterobcter cloacae* pojavili su se na području sjeverozapadne Hrvatske 2010. godine, a nakon toga na području Zagreba u velikim klinikama (131, 132). U nedavno obajvljenoj multicentričnoj studiji o proširenosti karbapenemazama u Hrvatskoj na području Slavonskoga Broda i pripadajuće regije tri izolata *K. pneumoniae* i jedan izolat *Enterobacter cloacae* dokazani su nositelji $bla_{\text{OXA-48}}$ gena (126). Prisutnost $bla_{\text{OXA-48}}$ gena dokazanoga u studijskim izolatima *E. coli* koji potječu s istoga područja kao prethodno navedeni izolati ukazuje na mogućnost međugeneracijskoga, konjugacijskoga prijenosa gena između različitih vrsta enterobakterija. Širenje karbapenem-rezistentnih izolata *E. coli* na područjima s visokom prevalencijom ESBL izolata otežava primjeren izbora antimikrobne terapije jer je prethodna upotreba karbapenema uz primjenu invazivnih medicinskih postupaka važan rizični činitelj za stjecanje infekcije karbapenem-otpornim izolatima. Izbor je terapije ograničen. Osim monoterapije kolistinom ili tigeciklinom kod teških infekcija uzrokovanih s karbapenem otpornim izolatom preporučuju se istovremena primjena tih dvaju antibiotika ili primjena kolistina s doripenemom. Unatoč dobroj *in vitro* osjetljivosti karbapenem-rezistentnih izolata na amikacin, gentamicin i fosfomicin ti antibiotici ipak ostaju

terapija drugoga izbora ili dodatak osnovnoj terapiji. Kliničke studije djelotvornosti ceftazidim-avibaktama pokazale su dobru djelotvornost na serinske β-laktamaze poput KPC. Kombinacija meropenem-veborbaktama pokazala je dobru djelotvornost na izolate s produkcijom A karbapenemaza, ali slabu djelotvornost na grupu B karbapenemaza i oksacilinaze (141, 142).

Iako su karbapenem-rezistentni izolati *E. coli* još uvijek sporadično prisutni u usporedbi s karbapenem-rezistentnom *K. pneumoniae* ili karbapenem-rezistentnim *Enterobacter cloacae*, novije studije ukazuju na udvostručenje broja karbapenem-rezistentne *E. coli* u brojnim zemljama tijekom zadnjega desetljeća. U azijsko-pacifičkoj regiji u početcima širenja otpornosti na karbapeneme opisani su karbapenem-rezistentni izolati *E. coli* koji su uz produkciju ESBL i AmpC enzima imali i promijenjenu propusnost porina. Izolate tih osobitosti vrlo su brzo zamijenili karbapenem-rezistentni OXA-48 izolati koji su istovremeno nosili $bla_{\text{CTX-M-1}}$ gen (142). Molekularnim testiranjima tijekom provođenja ove studije utvrđena je istovremena prisutnost $bla_{\text{OXA-48}}$ i $bla_{\text{CTX-M-1}}$ gena kod sedam testiranih izolata, kao što je prikazano u Tablici 5.9. Istovremena prisutnost raznovrsnih oblika otpornosti posljedica je epidemijske *potentnosti* tih dvaju gena, pripadajućih transpozona i insercijskih sekvencija. Širenje karbapenem-rezistentnih izolata unutar zdravstvenoga sustava najčešće se događa prijelazom pacijenata iz jedne ustanove u drugu ili preko ruku osoblja. Smanjenje uporabe antibiotika pokazalo se nedovoljnom mjerom u smislu obuzdavanja ili smanjenja otpornosti bakterija te je provođenje kontrole nad pacijentima (nadzorne kulture) i kontrole nad bolničkim mikro-ekosustavom uz strogo pridržavanje kontaktnih mjera zaštite, higijene ruku i dezinfekcije jedini način onemogućavanje prijenosa otpornih izolata i pripadajućih gena u bolničkome okružju (139, 141).

Primjena matematičkih modela za utvrđivanje mjesta i vremena kolonizacije *E. coli* ESBL producirajućim izolatima (bolnički odjeli ili izvanbolnički sustav zdravstvene skrbi, tj. zajednica) ukazala je na izvanbolničko okruženje kao glavno mjesto stjecanja kolonizacije otpornim izolatima uslijed velike ambulantne potrošnje antibiotika. Takvi rezultati upućuju na potrebu trajne edukacije u području izvanbolničkih sustava zdravstvene zaštite koja bi bila usmjerena na racionalnu primjenu i smanjenje upotrebe antibiotika. Na bolničkim odjelima uz kontrolu propisivanja antimikrobne terapije obavezno je provođenje mjera kontaktne izolacije i higijene ruku. Buduća primjena matematičkih modela osim podataka o izloženosti pacijenata antibioticima u zdravstvenome sustavu trebala bi dati i bolji uvid u načine prijenosa otpornih patogena i brzinu uklanjanja takvih mikroorganizama iz anatomskih područja pacijenata.

Buduće studije trebaju uzeti u obzir i primjenu antibiotika u ekstenzivnome uzgoju stoke i primjenu antibiotika u agronomiji. S postojećim podatcima i saznanjima dobivenim njihovom obradom moglo bi se ciljano djelovati na samome izvorištu stjecanja otpornih mikroorganizama, a ne na njegovoj krajnjoj točki, u bolničkome okružju (143).

U Hrvatskoj za sada nisu objavljene studije koje bi nam dale uvid u prisutnost β-laktamaza i epidemijskih plazmida u životinjskoj populaciji i okolišu. Uslijed kruženja tvari u prirodi očekivano je da se ljudski, životinjski i okolišni ekosustavi sa svim svojim osobitostima međusobno isprepliću i time izmjenjuju nova svojstva. Znatna uporaba antibiotika kao promotora rasta u ekstenzivnome uzgoju životinja, povećanje broja kućnih ljubimaca koji povremeno primaju antibiotike, povećanje broja turista koji donose vlastitu crijevnu floru te priljev migranata koji također donose vlastiti mikrobiom predstavljaju činitelje koji utječu na raznovrsnost genskoga materijala i predstavljaju potencijalnu prijetnju u smislu širenja raznovrsnih oblika otpornosti (123, 144).

7. ZAKLJUČAK

1. Rezultati istraživanja pokazali su da nema razlike u otpornosti na antibiotike između bolničkih i izvanbolničkih izolata ESBL producirajuće *E. coli.*

2. Dokazana je prisutnost *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena odgovornog za proizvodnju CTX-M β-laktamaza. Proizvodnja ovoga enzima vodi visokom stupnju otpornosti na sve cefalosporine što upućuje na CTX-M-15 alelsku inačicu koja za razliku od ostalih alelskih inačica učinkovito hidrolizira i ceftazidim.

3. Potvrđena je pretpostavka da su CTX-M β-laktamaze trenutno najčešći ESBL tip enzima u izolatima ESBL producirajućih *E. coli* koje cirkuliraju unutar našega zdravstvenoga sustava. CTX-M β-laktamaze jedinstveno su prisutne u 53 % studijskih izolata bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, uglavnom u izolatima iz urina. Istovremena prisutnost CTX-M i TEM β-laktamaza utvrđena je u 47 % studijskih izolata, podjednako u objema skupinama pacijenata. Prisutnost SHV β-laktamaza nije dokazana u studijskim izolatima.
4. Prisutnost insercijskih sekvencija IS*26* i IS*Ecp* utvrđena je uzvodno od *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ i *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gena u više od 50 % testiranih izolata, čime je potvrđena hipoteza da one imaju značajnu ulogu u mobilizaciji i ekspresiji *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena
5. Dilucijskim testiranjem osjetljivosti na antibiotike otkrivena je otpornost na karbapeneme kod 25 % izolata. Otpornost na karbapeneme potvrđena je dokazom *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena i insercijske sekvencije IS*1999.* IS*1999* prethodi *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genu i ima važnu ulogu u ekspresiji i širenju toga tipa rezistencije. Prisutnost raznovrsnih *bla* gena u studijskim izolatima ukazuje na sposobnost *E. coli* za stjecanje različitih tipova otpornosti na antibiotike.
6. Ovim istraživanjem potvrđena je prisutnost raznovrsnih inkompatibilnih grupa plazmida. Najučestalija je inkompatibilna plazmidna grupa B/O koja je prisutna u 87,5 % izolata, a slijede je grupa W prisutna u 64 % izolata te grupa A/C prisutna u 30 % izolata. Široka rasprostranjenost tih plazmida potvrđuje njhov horizontalni prijenos između izolata konjugacijom.
7. Genotipizacijom izolata utvrđena je poliklonalna diseminacija CTX-M producirajuće *E. coli.*
8. Rezultati genotipizacije ukazali su na visoku klonsku srodnost izolata iz iste ustanove i izolata s istih zemljopisnih područja. Unutar istih glavnih klonskih grupa svrstali su se

izolati iz različitih zdravstvenih ustanova i s različitoga zemljopisnoga područja, ali su ipak grupirani u različite podgrupe. Najveći broj izolata, 63 (68 %), pripada klonskoj grupi B, što potvrđuje vertikalni prijenos izolata unutar zdravstvenoga sustava, najvjerojatnije rukama zdravstvenih radnika.

9. Planetarno širenje CTX-M producirajuće *E. coli* mora se pozorno pratiti zbog sposobnosti takvih izolata za uspješno preuzimanje različitih tipova otpornosti i sposobnosti epidemijskoga širenja u bolničkoj i izvanbolničkoj populaciji putem različitih prenositelja.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj je istraživanja utvrditi proširenost CTX-M ESBL pozitivne *E. coli* među hospitaliziranim pacijentima i pacijentima iz zajednice s područja Brodsko-posavske i Vukovarsko-srijemske županije, utvrditi genetski profil β-laktamaza proširenoga spektra, odrediti inkompatibilne grupe epidemijskih plazmida koji kodiraju ESBL i ulogu insercijskih sekvencija IS*26* i IS*Ecp* u mobilizaciji $bla_{\text{CTX-M}}$ gena.

Nacrt studije

Povećanje prevalencije ESBL producirajuće *E. coli* uočeno je 2015. godine u uzorcima bolesnika hospitaliziranih u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu i među izvanbolničkim pacijentima s područja Brodsko-posavske županije koje gravitira navedenoj bolnici. Slična pojavnost u istome periodu uočena je i na području Vukovarsko-srijemske županije. Tijekom 2016. godine prospektivno su prikupljeni izolati pacijenata po pravilu 1 pacijent 1 izolat. Osnovni podatci o pacijentima dobiveni su iz medicinske dokumentacije.

Materijal i metode

Devedest i jedan izolat prikupljen je u periodu od 1. siječnja do 31. prosinca 2016. od pacijenata hospitaliziranih u općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu i izvanbolničkih pacijenata s područja Brodsko-posavske županije. Jedanaest izolata prikupljeno je od bolničkih i izvanbolničkih pacijenata s područja Vukovarsko-srijemske županije. Izolati su pokazali visoku rezistenciju na sve antibiotike osim karbapenema i amikacina.

Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je disk-difuzijskom metodom i mikrodilucijom u bujonu. Provedena su fenotipska testiranja za dokaz produkcije β-laktamaza. Testiranje prijenosa rezistencije ispitano je metodom konjugacije u bujonu, a genotipizacija izolata PFGE metodom. Molekularna karakterizacija β-laktamaza proširenoga spektra provedena je PCR metodom s početnicama za *bla* gene. Inkompatibilne grupe plazmida određene su PBRT metodom prema Carattoli. Prisutnost insercijskih sekvencija određena je metodom PCR mapiranja.

Rezultati

Gen *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ dokazan je kod 102 izolata. Kod 48 izolata dokazana je istovremena prisutnost *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ i *bla*$_{\text{TEM-1}}$ gena. Kod 54 izolata, uglavnom iz urina, dokazan je samo *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gen. Od 25 izolata s graničnim vrijednostima MIK-a za ertapenem 7 je testirano na prisutnost *bla*$_{\text{CARBA}}$ gena te je kod njih dokazana prisutnost *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gena. Sekvencioniranjem PCR produkata reprezentativnih uzoraka dokazan je *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gen. Transkonjugacijom dobiveni sojevi pokazali su iste fenotipske i genotipske karakteristike kao i izvorni izolati. Insercijska sekvencija IS*26* utvrđena je uzvodno od *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gena kod 47 od 88 testiranih izolata, a IS*Ecp* nađena je uzvodno od *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ kod 20 od 34 izolata s dokazanim *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ genom. Insercijska sekvencija IS*1999* prethodila je *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genu kod 7 testiranih izolata. PBRT metodom utvrđena je prisutnost raznovrsnih plazmidnih grupa, od kojih su najzastupljenije IncB/O, IncW i Inc A/C plazmidna grupa. PFGE genotipizacijom dokazane su četiri grupe (klastera) s više podgrupa u kojima su sadržani izolati iz različitih centara i s različitih zemljopisnih područja.

Zaključak

Ova studija ukazala je na široku rasprostranjenost CTX-M tipa β-laktamaza u populaciji bolničkih i izvanbolničkih pacijenata. Visoka incidencija ESBL *E. coli* u populaciji ima značajan utjecaj na povećanu potrošnju karbapenema i pojavu karbapenem-otpornih izolata.

Ključne riječi: *Escherichia c*oli, β-laktamaze, ESBL, *bla*$_{\text{CTX-M}}$.

9. SUMMARY

Clonal Dissemination of Highly Resistant *Escherichia coli* in Hospital Inpatients and Outpatients

Objectives

To determine the distribution of CTX-M ESBL positive *E. coli* among hospitalized and non-hospitalized patients from Brod-Posavina County and Vukovarsko-Srijemska County. To determine incompatibility groups of epidemic plasmids encoding ESBL and the role of insertion sequences IS*26* and IS*Ecp* in the mobilization of the $bla_{\text{CTX-M}}$ gene. To determine the genetic profile of extended spectrum β-lactamases.

Overview

High prevalence of *E. coli* ESBL isolates from various samples of patients hospitalized in the regional General Hospital in Brod-Posavina County was observed at the end of 2015. At the same time, high prevalence of ESBL-producing *E. coli* in urine samples was observed among outpatients gravitating towards the hospital. Similar prevalence of the *E. coli* ESBL isolates was observed in Vukovarsko-Srijemska County. Isolates were prospectively collected over the course of 2016, and 91 isolate (without copy-isolates) from Brod-Posavina County and 11 isolate from Vukovarsko-srijemska County were collected. The patient data was collected from medical records.

Materials and Methods

Ninety-one isolates were collected from January 1 to December 31, 2016 from patients hospitalized in GH in Slavonski Brod and from outpatients. Eleven isolates were collected from hospital patients and outpatients from Vukovarsko-Srijemska County. The isolates showed high resistance to all antibiotics except carbapenems.

Antibiotic susceptibility testing was performed by the disc-diffusion and microdilution method. Phenotypic tests were carried out to prove the production of β-lactamases. Transconjugation was performed to detect the resistance gene transfer. The isolates were genotyped using the PFGE method. Molecular characterization of ESBL β-lactamases was performed by *bla* gene primers using the PCR method. Plasmid incompatibility groups were determined by the PBRT method. The presence of insertion sequences was determined by the PCR mapping method.

Results

The *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ gene was found in all of 102 isolates. 54 isolates carried only *bla*$_{\text{CTX-M}}$. 48 isolates carried both *bla*$_{\text{CTX-M}}$ and *bla*$_{\text{TEM}}$. Seven of 25 isolates with borderline MIK values for ertapenem were tested for the presence of the *bla*$_{\text{CARBA}}$ genes, and the presence of the *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genes was demonstrated.

The *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene was detected in 34 out of 35 isolates and *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ was identified in one isolate. Strains obtained by transconjugation showed the same phenotypic and genotypic characteristics as the origin. Insertion sequence IS*26* was located upstream of the *bla*$_{\text{CTX-M}}$ gene in 47 out of the 88 tested isolates, and IS*Ecp* was found upstream of *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ in 20 out of the 34 isolates with the *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ gene. Insertion sequence IS*1999* preceded the *bla*$_{\text{OXA-48}}$ gene in 7 isolates. The presence of various plasmids groups was demonstrated, with IncB / O, IncW, Inc A / C being the most common types identified, while IncFII / IncFIC, IncX, IncL, IncK / B and IncL plasmids were less prevalent.

PFGE showed the existence of four 4 different clusters with isolates from different centres and from different geographic areas. Isolates from the same centre but different clinical wards obtained in different time showed high similarity in PFGE banding patterns pointing to cross-infection.

Conclusion

This study suggests a significant epidemiology change in the ESBL *E. coli* isolates and confirms the widespread distribution of CTX-M type β-lactamases in both the inpatient and outpatient population. High incidence of ESBL *E. coli* in patient population has a significant influence on the choice of therapy due to limited therapeutic options. High prevalence of ESBL isolates results in an increased carbapenem use which leads to increasing resistance to carbapenems due to carbapenemase production.

Key words: *Escherichia coli*, β-lactamases, ESBL, *bla*$_{\text{CTX-M}}$.

10. LITERATURA

1. Perković D, Ramljak Šešo M, Tambić Andrašević A. Enterobacteriaceae. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. ur. Medicinska bakteriologija i mikologija, 2 izd. Zagreb: Merkur A. B. D.; 2005:192-8.
2. Enterobacteriaceae. U: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken R. eds. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. Washington DC: Amwerican Society for Microbiology; 1999.
3. Tambić Andrašević A. i radna grupa Hrvatskog odbora za praćenje osjetljivosti i rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2013., 2014., 2015., 2016., 2017.
4. Livermore DM. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.
5. Bedenić B. β-laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji. Liječ Vjesn 2004; 126:314-24.
6. Medeiros AA. Evolution and dissemintion of β-lactamases accelerated by generation of β -lactams antibiotics. Clin Infect Dis 1997;24:S19-45.
7. Bush K. New β-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis 2001;32:1085-9.
8. Sykes BR, Matthew M. The β-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1976;2:115-57.
9. Lacey RW. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. Brit Med Bull 1984;40:77-83.
10. Bradford PA. Extended-Spectrum β-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistence Threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-51.
11. Ambler RP. The structure of β-lactamases. Philos Trans R Soc Lond 1980;289:321-31.
12. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with moleculare structures. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:1211-33.
13. Bush K. Jacoby G. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2010;54:969-76.

14. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. Res Microbiol 2004;155;409-21.
15. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β-lactamases by mutation. Clin Microbiol Infect 2008;14:11-32.
16. Nukaga M, Mayama K, Hujer AM, Bonomo RA, Knox JR. Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: On the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. J Mol Biol 2003;328:289-301.
17. Kenneth TS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. Emerg Infec Dis 2001;7:333-6.
18. Gniadkowsky M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect 2001;7:597-608.
19. Goussard S, Courvalin P. Updated sequence information for TEM beta-lactamases genes. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:367-70.
20. Juteršek B, Baraniak A, Zohar-Čretnik T, Storman A, Sadowy E, Gdniadkowski M. Complex endemic situation regarding extended-spectrum β-lactamase (ESBL) – producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Slovenia. Microb Drug Resist 2003;48:1204-14.
21. Sorlozano A, Gutierrez J, Palanca M, Soto MJ, Piedrola G. High incidence of extended-spectrum β-lactamases among outpatient clinical isolates of *Escherichia coli*: A phenotypic assessment of NCCLS guidelines and a comercial method. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;50:131-4.
22. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. J Chemother 1998;10:449-59.
23. Bonnet R. Growing of extended-Spectrum β-Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1-14.
24. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbio Rev 2005;18:657-86.
25. Sturenberg E, Mack D. Extended spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003;47:273-95.
26. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. BMJ 2003;327:1209-13.
27. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicy W, Gniadkowski M. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a

Klebsiella pneumoniae isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiellae. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1499-505.

28. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D and Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β-lactamases from *Enterobacteriaceae* Isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:534-7.
29. Sabate M, Navarro F, Miro E, Canpony S, Mirelis B, Barbe J, Prats G. Novel complex sul-type integron in *Escherichia coli* carryng *bla* (CTX-M-9). Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2656-61.
30. Gniadkowsky M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase zhat is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:827-32.
31. Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β-lactamases in *Enterobacteriaceae* from Indian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006;58:1260-3.
32. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among *Enterobacteriaceae* with their in vitro antimicrobial susceptibility. Indian J Med Microbiol 2011;29:161-4.
33. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β-Lactamases:worldwide emergence of clone ST131 025:H4. Int J Antimicrob Agents 2010;35:316-21.
34. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. Drug Resist Updat 2006;9:142-56.
35. Timofte D, Maciuca JE, Evans NJ, Williams H, Wattret A, Fick JC, Williams NJ. Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β-Lactamases from Bovine Mastitis Isolates in the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:789-94.
36. Naas T, Nordman P. OXA–type beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:785-90.
37. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:785-90.

38. Mugnier P, Casin L, Bouthors AT, Collatz E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum beta-lactamases selected in vitro or in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:3113-6.
39. Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2148-50.
40. Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper M, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffman KM. GES-18, a New Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type β-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* That Contains Ile80 and Ser170 Residues. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:396-401.
41. Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993;3:962-9.
42. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, Ozturk R, Soyletir G, Yildirim I, Avkan V. Chracterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: Molecular epidemiology of PER-1 producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. J Clin Microbiol 1996;34:2942-6.
43. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Danish Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci 2015;22:90-101.
44. Jacoby GA. AmpC ß-lactamases. Clin Microb Rev 2009;22:161-82.
45. Thomson KS. Extended-Spectrum-β-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. J Clin Microbiol 2010;48:1019-25.
46. Yang K, Guglielmo BJ. Diagnosis and Treatment of Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamase-producing Organisms. Ann Pharmacother 2007;41:1427-35.
47. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011;17:1791-8.
48. Poirel L, Thomas IL, Naas T et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β-lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:622-32.
49. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U. S. Rivers. Emerg Infect Dis 2005; 11:260-4.
50. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β-Lactamases: Are They All Carbapenemases? Antimicrob Agents Chemother 2014;58:2119-25.

51. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippen A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1987;2:302-6.

52. Goosens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β-lactamase and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 2001;41:183-9.

53. European Antimicrobial Resistance Surveillance system. The ECDC 2015. Dostupno na adresi: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf.

54. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh PR, Paterson DL. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:3280-4.

55. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to 317 *Escherichia coli*: an ovelooked epidemic. Microbes Infect 2003;5:449-56.

56. Johnson JR, Murray AC, Kuskowski MA, Schubert S, Prere M-F, Picard B, Colodner R, Raz R. Distribution and characteristic of *Escherichia coli* clonal group A. Emerg Infect Dis 2005;11:141-5.

57. French GI, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam betalactamase inihibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. J Clin Microbiol 1996; 34:358-63.

58. Kaufmann ME. Pulsed-Field Gel Elektrophoresis. U: Woodford N, Johnsons A. eds. Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications. 1st ed. New York: Humana Press Inc. Totowa 1998;33-51.

59. Tenover F, Arbeit R, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9.

60. Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E-test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15:398-402.

61. Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β-lactamases. FEMS Microbiol Lett 1995;134:203-8.
62. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended spectrum β-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother 2004;54:735-43.
63. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, Daturi R, Romero E, Rossolini GM. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum β-lactamase in Northern Italy. J Clin Microbiol 2004;42:2523-9.
64. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of CTX-M beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2006;57:154-5.
65. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamaze-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 2008;8:159-66.
66. Tambić Andrašević A, Bukovac A, Jelić M, Šoprek S, Gužvinec M. *Escherichia coli* – od komenzala do multiplorezistentnog uropatogena. Croat J Infect 2014;34:189-94.
67. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominentcause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. J Clin Microbiol 2013;5:3270-6.
68. Tzouvelakis LS, Tzelepi E, Tassious PT, Legakis NJ. CTX-M-type β-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzyimes. Int J Antimicrob Agents 2000;14:137-43.
69. Phan MD, Peters KM, Sarkar S, Lukowski SV, Allsopp LP, Moriel DG, Ackard MES, Totsika M, Marshall VM, Upton M, Beatson SA, Schembri MA. The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. PLOS Genet 2013;9:e1003834.
70. 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;35:736-55.

71. Payerl Pal M, Tambić Andrašević A. Potrošnja antibiotika u Hrvatskoj. U: Tambić Andrašević A, Tambić T. ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2013. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2012:145-69.
72. Giakkoupi P, Tambic-Andrasevic A, Vourli S, Skrlin J, Sestan-Crnek S, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. Transferable DHA-1 cephalosporinase in Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents 2006;27:77-80.
73. Butić I, Tambić Andrašević A. Testiranje izolata posebnog značaja. U:Tambić Andrašević A, Tambić T. ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2013. g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2012:133-44.
74. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2008;14:144-53.
75. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Rohnisch T, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium.* Infection 1992;20:158-63.
76. Bauernfeind A, Grimm H, Shweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection 1990;18:294-8.
77. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population based laboratory surveillance for *E. coli* producing ESBL: importance of community isolates with $bla_{\text{CTX-M}}$ genes. Clin Infect Dis 2004;38:1736-41.
78. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Joregensen JH. First report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β-lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL isolated in a U.S. Health Care System. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:4015-21.
79. Vranić-Ladavac M, Bosnjak Z, Beader N, Barišić N, Kalenić S, Bedenić B. Clonal spread of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* in a Croatian hospital. J Med Microbiol 2010;59:1069-78.
80. Tonkić M. Molekularna karakterizacija sojeva *Escherichia coli* koji luče β-laktamaze proširenog spektra izoliranih u dječjoj i odrasloj populaciji. Doktorska disertacija. Split: Medicinski fakultet; 2006.
81. Novick RP. Plasmid incopatibility. Microbiol Rev 1987;51:381-95.

82. Bengtsson S, Nasser U, Sundsfjord A, Kahlmeter G, Sundqvist M. Sequence types and plasmid carriage of uro-pathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance. J Antimicrob Chemother 2012;67:69-73.
83. Valverde A, Canton R, Galan JC, Nordmann P, Baquero F, CoqueTM. In 117, an unusual In()-like class 1 integron containing CR1 and *bla*$_{(CTX-M-2)}$ and associated with Tn21-like element. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:799-802.
84. Blasquez J, Morosini M-I, Negri M-C, Baquero F. Selection of naturally occuring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:2182-4.
85. Silwedel C, Vogel U, ClausH, Glasera K, Speera CP, Wirbelauera J. Outbreak of multidrug-resistant *Escherichia coli* sequence type 131 in a neonatal intensive care unit: efficient active surveillance prevented fatal outcome. J Hosp Infect 2016;93:181-6.
86. Rice LB, Eckstein EC, DeVente J, Shlaes DM. Ceftazidime resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. Clin Infect Dis 1996;23:118-24.
87. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infection caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β-lactamases (ESBL). Clin Microbiol Infect 2000;6:460-3.
88. Prakash V, Lewis JS, Herrera ML, Wickes BL, Jorgensen JH. Oral and Parenteral Therapeutic Options for Outpatient Urinary Infections Caused by *Enterobacteriaceae* Producing CTX-M Extended-Spectrum β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1278-80.
89. Antony SJ. The Changing Epidemiology of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) Infections of the Urinary Tract Focusing on Clinical Resistance and Therapeutic Options. Dostupno na adresi: https://www.intechopen.com/books/clinical-management-of-complicated-urinary-tract-infection/the-changing-epidemiology-of-extended-spectrum-beta-lactamases-esbl-infections-of-the-urinary-tract-infections
90. Han SB, Lee SC, Lee SY, Jeong DC, Kang JH. Aminoglycoside therapy for childhood urinary tract infection due to extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* or Klebsiella pneumoniae. BMC Infect Dis 2015;15:414.
91. D'Angelo RD, Johnson JK, Bork JT, Heil EL. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. Expert Opin Pharmacother 2016;17:953-67.

92. Cho S-Y, Choi S-M, Park SH, Lee D-G, Choi J-H, Yoo J-H. Amikacin therapy for urinary tract infections caused by extended-spectrum β-lactamase producing *Escherichia coli*. Korean J Intern Med 2016;31:156-61.
93. Yusuf N, Faris S, Al Subal I. Relationship of ESBL production with fluoroquinolones resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates: The remaining antibiotics as drug of choice for treatment the infections caused by these strains. Dostupno na adresi: http://www.academia.edu/6846373/2013.
94. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. J Clin Microbiol 2009;47:969-74.
95. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Commitee of Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints. EUCAST 2017. Version 7.0. Dostupno na adresi: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (update 13.03.2017.).
96. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 27th ed. M 100-S27. Wayne, PA, USA:CLSI; 2017.
97. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Comitee of Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST 2017. Version 2.0. Dostupno na adresi: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (update 11. 07. 2017.).
98. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum β-lactamases (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen. J Clin Microbiol 1996;34:1880-4.
99. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bottger EC, Hombach M. Practical Approach for Reliable Detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2011;49:2798-803.
100. CDC. Dostupno na adresi: http://www.ndhealth.gov/microlab/Uploads/HodgeTest.pdf.
101. Grimm V, Satoshi E, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA Microarrays for Rapid Genotyping of TEM Beta-Lactamases That Confer Resistance. J Clin Microbiol 2004;42:3766-74.
102. Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). J Antimicrob Chemother 1996;37:797-802.

103. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 2005;63:219-28.

104. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:3140-5.

105. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Asses Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLoS ONE 2015;10:e0123690.

106. Elwell LP, Falkow S. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. U: Lorian V. ed. Antibiotics in laboratory Medicine. 2nd ed. Baltimore MD:Williams and Wilkins; 1986;683-721.

107. Kalenić S. Metabolizam i genetika bakterija. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. ur. Medicinska bakteriologija i mikologija, 2. izd. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2005:25-38.

108. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM. Replicon Typing of Plasmids Encoding Resistance to Newer β-lactams. Emerg Infect Dis 2006;12:1145-8.

109. Carattoli A, Sieffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. PLoS One 2015;10:e0123063.

110. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18:268-81.

111. Tonkic M, Bedenic B, Goic-Barsic I, Katic S, Kalenic S, Kaufmann ME, Woodford N, Punda-Polic V. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. J Chemother 2007;19:97-100.

112. Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fiett J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, Gniadkowski M. *Bla*$_{\text{CTX-M}}$ genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new (*bla*$_{\text{CTX-M-3}}$) and widely spread (*bla*$_{\text{CTX-M-3a}}$ and *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$) genetic structures. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1630-5.

113. Bedenić B, Randegger C, Stobberingh E, Haechler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in Zagreb, Croatia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:505-8.

114. Bedenić B, Vraneš J, Hofmann-Thiel S, Tonkić M, Novak A, Bučević Popović V, Hoffmann H. Characterization of the extendedspectrum β-lactamases and determination of the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children. Wien Klin Wochenschr 2012;124:504-15.

115. Brolund A. Overview of ESBl-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. Infect Ecology Epidemiol 2014;4:24555.

116. Garner IS, Jarwis JR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions of nosocomial infections. Am J Infect Control 1988;16;128-40.

117. Merino I, Hernàndez-Garcia M, Turrientes M-C, Pérez-Viso B, López-Fresneña N, Diaz-Argero C, Maechler F, Fankhauser-Rodriguez C, Kola A, Schrenzel J, Harbarth S, Bonten M, Gastmeier P, Canton R, Ruiz-Garbajosa P; R-GNOSIS Study Group. Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. J Antimicrob Chemother 2018;73:2973-80.

118. Kang C-I, Wi YM, Ko KS, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song J-H. Outcomes and risk factors for mortality in community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, with special emphasis on antimicrobial therapy. Scand J Infect Dis 2013;45:519-25.

119. Rodriguez - Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Rios MJ, Hernandez JR, Pascual A. Bacteremia due to Extended-Spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M Era: A New Clinical Challenge. Clin Infect Dis 2006;43:1407-14.

120. Marijan T, Plečko V, Vraneš J, Džepina AM, Bedenić B, Kalenić S. Characterisation of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine of nonhospitalized patients in the Zagreb region. Med Glas(Zenica) 2010;7:46-53.

121. Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes on Abiotic Touch Surfaces: Implications for Public Health. mBIO 2012;11(3):489-512.

122. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar A, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2018;73:1-17.

123. Galán JC, González-Candelas F, Rolain JM, Cantón R. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β-lactamase world. Front Microbiol 2013;4:9.

124. Tadesse DA, Li C, Mukherjee S, Hsu C-H, Bodeis Jones S, Gaines SA, Kabera C, Loneragan GH, Torrence M, Harhay DM, McDermott PF, Zhao S. Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing *Escherichia coli* Isolates from retail Meats and Cattle in the United States. Microb Drug Res 2018;24:939-48.

125. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen SJ, Voets GM, van den Munckhof A, van Essen-Zandbergen T, Platteel AC, Fluit N, Sande-Bruinsma J, Scharinga MJ, Bonten MJ, Mevius DJ; National ESBL Surveillance Group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clin Microbiol Infect 2011;17:873-80.

126. Chen LF, Freeman JT, Nicholson B, Keiger A, Lancaster S, Joyce M, Woods CW, Cook E, Adcock L, Louis S, Cromer AL, Sexton DJ, Anderson DJ. Widespread dissemination of CTX-M-15 genotype extended-spectrum-beta lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among patients presenting to community hospitals in the southeastern United States. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:1200-2.

127. Bedenić B, Slade M, Žele-Starčević L, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujić Atalić V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić Paradžik M, Tot T, Lukić-Grlić A, Drenjančević D, Varda-Brkić D, Bandić-Pavlović D, Mihaljević S, Zarfel G, Gužvinec M, Conzemius R, Barišić I, Tambić-Andraševic A. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. J Med Microbiol 2018;67:1031-41.

128. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2016;15:20.

129. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. Front Microbiol 2013;4:15.

130. Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. A novel IS26 structure surrounds *bla*CTX-M genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. J Med Microbiol 2010;59:580-7.

131. Partrige SR, Ellem JA, Tetu SG, Zong Z, Paulsen IT, Iredell JR. Complete sequence of pJIE143, a pir-type plasmid carryng IS*Ecp* 1-$bla_{\text{CTX-M-15}}$ from an *Escherichia coli* ST131 isolate. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:5933-5.

132. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J, Bošnjak Z, Varda-Brkić D, Lukić-Grlić A, Mareković I, Frančula-Zaninović S, Krilanović M, Šijak D, Grisold A, Zarfel G. Molecular characterization of class B carbapenemases in an advanced stage of dissemination and emergence of class D carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. Infect Genetic Evol 2016;43:74-82.
133. Jelić M, Škrlin J, Bejuk D, Košćak I, Butić I, Gužvinec M, Tambić-Andrašević A. Characterization of Isolates Associated with Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. Microb Drug Resist 2018;24:973-9.
134. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Re-act-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:813-21.
135. Wang J, Huang X-Y, Xia Y-B, Guo Z-W, Ma Z-B, Yi M-Y, Lv L-C. Clonal Spread of *Escherichia coli* ST93 Carrying mcr-1-Harboring cN1-IncHI2/ST3 Plasmid Among Companion animals, China. Front Microbiol 2018;8:2989.
136. Bai Fengjia, Li X, Niu B, Zhang Z, Malakar PK, Liu H. A mcr-1-Carrying Conjugative IncX Plasmid in Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST278 Strain Isolated From Dairy Cow Feces in Shanghai, China. Front Microbiol 2018;9:2833.
137. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2950-4.
138. Pfeifer Y, Schlatterrer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Holdfelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German Hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:2125-8.
139. Manageiro V, Ferreira E, Pinto M, Canica M. First description of OXA-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:7613-4.
140. Timofte D, Panzaru CV, Maciuca IE, Dan M, Mare AD, Man A, Toma F. Active surveillance scheme in three Romanian hospitals, reveals a high prevalence and variety of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: a pilot study, December 2014 to May 2015. Euro Surveill 2016;21(25).
141. Tada T, Tsuchiya M, Shimada K, Nga TT, Thu LT, Phu TT, Ohmagari N, Kirikae T. Dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with

various combinations of carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16srRNA methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. BMC Infect Dis 2017;17:467.

142. Manageiro V, Romão R, Barata Moura I, Sampaio DA, Vieira L, Ferreira E, the Network EuSCAPE-Portugal, Caniça M. Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Portugese Hospitals: Results From European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). Front Microbiol 2018;9:2834.
143. Jean S-S, Lee N-Y, Tang H-J, Lu M-C, Ko W-C, Hsueh P-R. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. Taiwan Aspects. Front Microbiol 2018;9:2888.
144. Knight GM, Costelloe C, Deeny SR, Moore LSP, Hopkins S, Johnson AP, Robotham JV, Holmes AH. Quantifying where human acquisition of antibiotic resistance occurs: a mathematical modelling study. BMC Medicine 2018;16:137-47.
145. Heudorf U, Krackhardt B, karathana M, Kleinkauf N, Zinn C. Multidrug-resistant bacteria in unaccompanied refugee minors arriving in Frankfurt am Main, Germany, October to November 2015. Euro Surveill 2016;21(2).

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 12. rujna 1964. godine u Puli. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje završila sam u Rijeci. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci upisujem 1983. Diplomirala sam u travnju 1989. godine. Završila sam i Osnovnu muzičku školu *Ivan Matetić-Ronjgov* u Rijeci, instrument pijanino.

Po završetku fakulteta odlazim u Slavonski Brod, gdje sam se u lipnju 1989. godine zaposlila u zdravstvenoj ustanovi Medicinski centar *Slavonski Brod*. Nakon jednogodišnjega staža i položenoga stručnog ispita radila sam u različitim ordinacijama opće/obiteljske medicine, nakon čega sam dobila stalno radno mjesto u ambulanti Sibinj – Grgurevići, u kojoj sam radila do kraja siječnja 1994. godine. Početkom 1994. godine prelazim u Službu za mikrobiologiju koja je tada bila dio Medicinskoga centra u Slavonskome Brodu. Prolazim specijalističku edukaciju te polažem specijalistički ispit 1998. godine, nakon kojega kao specijalist Medicinske mikrobiologije s parazitologijom radim u Zavodu za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije. Nakon završenoga poslijediplomskoga studija Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu magistrirala sam 2005. godine s temom *Procjena vrijednosti različitih metoda određivanja rezistencije meticilin-rezistentnoga* Staphylococcus aureus *na glikopeptidne antibiotike*.

Od povratka sa specijalizacije bavim se dijagnostikom infektivnih stanja hospitaliziranih pacijenata i bolnički stečenih infekcija. Član sam Povjerenstva za nadzor nad infekcijama povezanim sa zdravstvenom skrbi Opće bolnice *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu od 2005. godine. Uvela sam automatiziranu serološku i molekularnu dijagnostiku zaraznih bolesti u rutinsku dijagnostičku ponudu Službe za kliničku mikrobiologiju ZZJZ-a Brodsko-posavske županije dok sam obnavljala dužnost voditelja Službe od 2012 do 2017. godine. Od 2009. godine naslovni sam asistent na Katedri za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Kao član Povjerenstva za specijalizacije Ministarstva zdravstva, sudjelovala sam u kreiranju i donošenju novoga specijalističkog programa 2011. godine. Stručna titula *primarijus* odobrena mi je 2013. godine. Osposobljena sam za rad na različitim dijagnostičkim platformama i sustavima molekularne dijagnostike (*Digene* platforma, *Xpert* sustav, PFGE), serološke dijagnostike (EIA/ELFA platforma), kao i za rad na imunofluorescentnome mikroskopu.

Autorica sam i koautora brojnih stručnih i znanstvenih radova objavljenih u domaćim i inozemnim indeksiranim časopisima i(li) prezentiranih na simpozijima i kongresima u zemlji i inozemstvu. Opisala sam prvi slučaj humane, okularne telazioze u Hrvatskoj. Članica sam Hrvatskoga liječničkoga zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskoga društva za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju, Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike pri Akademiji medicinskih znanosti RH. Članica sam ESCMID-a (*Europsko društvo kliničke mikrobiologije i zaraznih bolest*i) i EARSS-net mreže (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System-net*) koja prati rezistenciju na antibiotike na području EU.

Tijekom Domovinskoga rata uz svakodnevni posao, a prema ratnome rasporedu, radila sam na trijaži u Općoj bolnici *Dr. Josip Benčević* u Slavonskome Brodu od 1. kolovoza 1991. do 20. ožujka 1993. godine te sam nositeljica statusa braniteljice Domovinskoga rata.

POPIS RADOVA

CURRENT CONTENTS

1. Tomić Paradžik M, Drenjančević D, Presečki-Stanko A, Kopić J, Talapko J,Zarfel G, Bedenić B. Hidden Carbapenem Resistance in OXA-48 and Extended-Spectrum β-Lactamase-Positive Escherichia coli. Microb Drug Resist 2019:Jan 7. doi: 10.1089/mdr.2018.0309 [Eepub ahead of print].
2. Bedenić B, Slade M, Žele-Starčević L, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujić Atalić V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić Paradžik M, et. Al Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. J Med Microbiol 2017;67(8):1031-1041.
3. Tomić Paradžik M, Samardžić K, Živičnjak T, Martinković F, Janjetović Ž, Miletić-Medved M. Thelazia callipaeda – first human case of thelaziosis in Croatia. Wiener klinische Wochenschrift 2016;128(5-6):221-223.
4. Kopić J, Tomić Paradžik M. Expanding the Use of Noninvasive Ventilation During an Epidemic. Disaster Medicine and Public Health Preparedness. Disaster Medicine and Public Health Preparedness 2014;8(4):310-314.
5. Jurišić I, Tomić Paradžik M, Jurić D, Kolovrat A, Cvitković A. National program of Colorectal Cancer Early Detection in Brod Posavina County (East Croatia). Coll Antropologicum 2013;37(4):1223-27.

6. Pandak N, Pajić-Penavić I, Sekelj A, Tomić Paradžik M i sur. Bacterial Colonisation or Infection in Chronic Sinusitis. Wiener klinische Wochenschrift 2011;123:1-4.
7. Kopić J, Tomić Paradžik M, Pandak N. Streptococcus Suis Infection as Cause of Severe Ilness: 2 cases from Croatia. Scandinavian Journal of infectious Diseases 2002; 34(9):683-684.

SCIENCE CITATION INDEX

1. Holik H, Coha B, Šiško M, Tomić-Paradžik M. Leuconostoc sp. Meningitis in a patient Treated with Rituximab for Mantle Cell Lymphoma. Turk J Hematol 2015; 32(3):271-274.
2. Petanović M, Tomić Paradžik M, Krištof Ž, i sur. Scopuraiopsis brevicaulis as the Cause of dermatomycosis. Acta Dermatolovenerologica Croatica 2010;18(1):8-13
3. Talapko J, Drenjančević D, Stupnišek M, Tomić Paradžik M, Kotris I, Bogdan M, Sikirić P. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of pentadecapeptide BPC 157. Prihvaćen za objavljivanje u Acta Clinica Croatica 2018;57.

INDEX MEDICUS

1. Samardžić K, Tomić Paradžik M, Janjetović Ž i dr. Prvi slučaj okularne telazioze u Hrvatskoj. Acta Med Croatica, 2016;69(5):475-479.
2. Tomić Paradžik M, Mihić J, Kopić J, Mlinarić Missoni E. Invazivna trihosporonoza uzrokovana sa Trichosporon asahii kod politraumatiziranog, neurokirurškog bolesnika: prikaz slučaja. Acta Medica Croatica 2012;66(5):397-401.
3. Tomić Paradžik M, Levojević B, Gabrić A. Smanjenje incidencije infekcija mokraćnog sustava u kateteriziranih bolesnika nakon edukacije zdravstvenih radnika i uvođenja postupnika i nadzornih lista. Liječnički vjesnik 2011;133(1-2):15-19.
4. Plečko V, Budimir A, Kučišec-Tepeš N, Tomić Paradžik M i sur. Imali u Hrvatskoj sojeva Staphylococcus aureus heterorezistentnih na vankomicin? Acta Medica Croatica 2004;58(4):263-268.
5. Kopić J, Tomić Paradžik M, Pandak N. Infekcija uzrokovana sa Streptococcus suis, zoonoza na koju treba misliti – prikaz dvaju bolesnika. Liječnički vjesnik 2003; 125(5-6):134-137.

SCOPUS

1. Tomić Paradžik M, Mahovne Z. Pneumokokna cista pankreasa. Medicina 2009; 45(4):389-393.
2. Tomić Paradžik M, Hanih M. U povodu izolacije vankomicin- rezistentnog enterokoka u Slavonskom Brodu. Liječnički vjesnik 2007;129(1-2):46-47.
3. Pandak N, Tomić Paradžik M i sur. Važnost sistemskih infekcija izazvanih bakterijom Streptococcus bovis. Liječnički vjesnik 2006;128(7-8):206-209.
4. Samardžić K, Tomić Paradžik M, Janjetović Ž i sur. Prvi slučaj okularne telazioze u Hrvatskoj. Acta Med Croatica 2016;69(5):475-480.
5. Janjetović Ž, Vuković Arar Ž, Tomić Paradžik M, i sur. Okulana dirofilarioza – prikaz boelsnice. Acta Medica Croatica 2010;64(1):41-45.
6. Štivić F, Tomić Paradžik M. Meningoencefalitis uzrokovan bakterijom Listeria monocytogenes u imunokompetentne mlade žene:prikaz slučaja. Medicina Fluminensis 2018;54(3):329-333.

NEINDEKSIRANI ČLANCI

1. Petanović M, Tomić Paradžik M., Krištof Ž. Praćenje rezistencije bakterija na antibiotike na području Slavonskog Broda. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, Zagreb 2006;2(7):1-3.
2. Tomić Paradžik M. Nespecifični uzročnici spolno-prenosivih bolesti u Brodsko-posavskoj županiji u 2005. godini. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, Zagreb 2006;2(7):1-2.
3. Levojević B, Tomić Paradžik M. MRSA – obavijest za bolesnike. Tim za nadzor nad bolničkim infekcijama OB dr J. Benčević u suradnji sa Referentnim centrom za bolničke infekcije Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH, KBC Zagreb. Plavi fokus 2008;4(2):58-59.
4. Tomić Paradžik M, Kopić J. Nadzor nad MRSA u JIL-u – petogodišnje iskustvo. Acta Anaesthesiologica Croatica 2011;8(1):1-5.
5. Kalinić S i sur. Smjernice za prevenciju, kontrolu i liječenje infekcija koje uzrokuje MRSA. Liječnički vjesnik 2008;Supl 1:13.4.-Appendix 3. Obavijest za bolesnike: 29.
6. Tomić Paradžik M, Mihić J, Kopić J, Mlinarić Missoni E. Invasive Trichosporonosis in a Critically Ill ICU Patient: Case Report. Clinical Microbiology:Open Access 2015;4(4): http://dx doi. Org/10. 4172/2327-5073. 1000210.

7. Tomić Paradžik M, Andrić D, Drenjančević D, Talapko J. The First Evidence of Epidemic Strain Clostridium Difficile (027/NAP1/BI) in Eastern Croatia. Jour Clin Microbiol and Biochem Technol 2017;3:14-16 doi:10.17352/jcmbt.000019 (međunarodna recenzija, case report, stručni) (Manuscript number - JCMBT-17-CR-123).
8. Živković K, Kurevija T, Haršanji Drenjančević I, Bogdan M, Tomić Paradžik M, Talapko J, Drenjančević D. To Biofilm or Not to Biofilm. SEEMEDJ 2018;2(1):12-19.

POGLAVLJE U KNJIZI

1. Sušić E, Tomić Paradžik M. Enterobacteraceae. u: Medicinska mikrobiologija, Uzunović-Kamberović S, ur. Fojnica:Štamparija 2009. ISBN 978-9958-585-70-8. COBISS . BH – ID 17107462.

MAGISTARSKA DISERTACIJA

Tomić Paradžik M. Procjena vrijednosti različitih metoda određivanja rezistencije meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* na glikopeptidne antibiotike, magistarski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2005.

KONGRESNI SAŽETCI

1. Tomić Paradžik M, Petanović M. Analiza bakterijemija u OB „Dr J. Benčević“ tijekom tri mjeseca, knjiga sažetaka: 5. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i infektologije (Zagreb, 14. – 16. listopada 1999.)
2. Pandak N, Tomić Paradžik M, i sur. Ehinokokoza – dijagnostički problem, knjiga sažetaka: Sastanak o ehinokokozi Sredozemnog područja, ZZJZ županije Splitsko-dalmatinske u sur. sa Mediteranean Society of Chemotherapy (Split, 10. – 13. veljače 2000.)
3. Pandak N, Tomić Paradžik M. Infekcije kirurških rana, knjiga sažetaka: 4. Znanstveno-stručni sastanak, HDI (Varaždin, 23. – 26. svibnja 2002.)
4. Tomić Paradžik M, Kopić J, Pandak N. Infekcija uzrokovana sa *Streptococcus suis* – zoonoza na koju treba misliti, knjiga sažetaka: 6. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije sa međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 15. – 17. svibnja 2002.)
5. Petanović M, Tomić Paradžik M. Naša iskustva sa pretragom MGIT, knjiga sažetaka: 6. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije sa međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 15. – 17. svibnja 2002.)

6. Petanović M, Aberle N,Tomić Paradžik M, Krištof Ž. Detection of *Mycobacteria* using MGIT in Slavonski Brod, Croatia, in Abstract Book: 23. Annual Congress of the European Society of Micobacteriology (Dubrovnik, 23. – 26. lipnja 2002.)
7. Tomić Paradžik M, Sušić E. Sensitivity of the *E. coli* blood isolates and comparasion with the sensitivity in the population-review of the results from two centres, in Abstract Book: CESAR 2003 (Central European Symposium on Antimicrobial Resistance), (Brijuni, Croatia, 4. – 7. srpnja 2003.)
8. Krištof Ž, Tomić Paradžik M. Activation of Tuberculosis by an Immunocompromised Patient, in Abstrac Book: 24. Annual Congress of the European Society of Micobacteriology (Tartu, Estonia, 29. – 2. srpnja 2003.)
9. Petanović M, Tomić Paradžik M, Krištof Ž. Rezistencija bakterija na antibiotike na području Slavonskog Broda, knjiga sažetaka: 1. hrvatski kongres preventivne medicine i unapređenja zdravlja (Zagreb, 26. – 29. studenoga 2003.)
10. Tomić Paradžik M, Kopić J. Antimicrobial Resistance of Tracheal Aspirates in ICU, in Abstract Book: Fifth Congress of the International Federation of infection Control (Poreč, Croatia, 9. – 12. listopada 2004.)
11. Levojević B, Marić E, Tomić Paradžik M. Sharps Injuri. Abstrct Book: Fifth Congress of the International Federation of infection Control (Poreč, Croatia, 09. – 12. 10. 2004)
12. Tomić Paradžik M, Smiljanić D. Infekcije kirurške rane kod neurokirurških bolesnika, knjiga sažetaka: 7. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 18. – 20. svibnja 2005.)
13. Kalenić S, Budimir A, Sušić E, Tomić Paradžik M, i sur. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* u Hrvatskoj, knjiga sažetaka. V hrvatski simpozij o rezistenciji bakterija na antibiotike (Zagreb, 2005.)
14. Tomić Paradžik M, Petanović M. Distribution of O-antigen Serotypes and Susceptibility Data in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Different Hospital wards, knjiga sažetaka: 5. hrvatski kongres o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem (Zadar, 23. – 27. rujna 2006.)
15. Krištof Ž, Cvitković A, Tomić Paradžik M, Petanović M. Spondylodiscitis specifica segm. L4L5-report case, in Abstract Book: 28th Annual Congress of the European Society of Micobacteriology (Athens, Greece, 1. – 4. srpnja 2007.)
16. Cvitković A, Krištof Ž, Pandak N, Marić Z, Petanović M, Tomić Paradžik M, Čabraja I. Salmoneloze kod osoba pod zdravstvenim nadzorom na brodskom području 2001-2006 godine, knjiga sažetaka: Infektivne bolesti probavnog sustava, multidisciplinarni

pristup, 72. znanstveno-stručni simpozij s međunarodnim sudjelovanjem (Vinkovci, 23. – 26. svibnja 2007.)

17. Tomić Paradžik M, Mlinarić-Missoni E, Važić-Babić V, i sur. Kandidemija u hospitaliziranih bolesnika:epidemiologija,vrste i osjetljivost uzročnika, knjiga sažetaka: 8. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem (Zagreb, 25. – 28. svibnja 2008.)
18. Ivančić Z, Jurić D, Tomić Paradžik M, Marić Z. Primjena gvajak testa (Hemognost®) u provođenju nacionalnog programa ranog otkrivanja raka debelog crijeva, knjiga sažetaka: 2. hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike s međunarodnim sudjelovanjem (Šibenik, 8. – 11. svibnja 2008.)
19. Petanović M, Tomić Paradžik M, Cvitković A, Ivić-Hofman I. Analiza salmonela izoliranih 2008. godine., knjiga sažetaka: III. požeški simpozij s međunarodnim sudjelovanjem „Novosti u prevenciji, etiološkoj dijagnostici i liječenju infektivnih bolesti“ (Požega, 18. – 20. lipnja 2009.)
20. Krištof Ž, Petanović M, Tomić Paradžik M. Twenty years of NTM in Microbiological Laboratories in Public Health Organization of Brod-Posavina County, Slavonski Brod, Croatia, Abstract Book:31stAnnual Congress of the European Society of Mycobacteriology (Bled, Slovenia, 4. – 7. srpnja 2010.)
21. Tomić Paradžik M, Mlinarić Missoni E, Mihić J, Krištof Ž. *Trichosporon asahii* fungemija kod neurokirurškog pacijenta: prikaz slučaja, knjiga sažetaka: 9. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem (Primošten, 7. – 9. travnja 2011.)
22. Tomić Paradžik M, Krištof Ž, Petanović M. Spolno prenosivi patogeni na području Brodsko-posavske županije kroz 8 godina, knjiga sažetaka: 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem (Opatija, 20. – 22. svibnja 2011.)
23. Ivančić Z, Pavetić R, Jurić D, Rečić S, Cvitković A, Tomić Paradžik M. Dokaz antigena norovirusa brzim imunokromatografskim testom (Azog Norovirus Test Device), knjiga sažetaka: 1. Kongres hrvatske komore zdravstvenih radnika s međunarodnim sudjelovanjem, (Baška, otok Krk, 18. – 21. travnja 2012.)
24. Tomić Paradžik M, Levojević B, Krištof Ž, Cvitković A. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* blood isolates: a 6-year study, kniga sažetaka: 3rd Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, (Dubrovnik, 8. – 11. studenoga 2012.)

25. Tomić Paradžik M, Šiško M, Miletić-Medved M, Ivić-Hoffman I, Krištof Ž. Meningoencefalitis uzrokovan bakterijom *Listeria monocytogenes* u imunokompetentne mlade žene: prikaz slučaja, knjiga sažetaka: 10. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 7. hrvatski kongres o infektivnim bolestima, CROCMID, (Rovinj, 24. – 27. listopada 2013.)
26. Tomić Paradžik M, Samardžić K, Janjetović Ž, i sur. Prvi slučaj okularne telazioze u Hrvatskoj: prikaz bolesnika, knjiga sažetaka: 82. Znanstveno-stručni simpozij ZOONOZE, (Slavonski Brod, 28. – 30. svibnja 2015.)
27. Tomić Paradžik M, Kožul B, Mlinarić Missoni E, Čičmek Lj. *Sporotrix schenckii*, bolest ružinog trna-prikaz slučaja. Knjiga sažetaka:11. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije, 8. Hrvatski kongres o infektivnim bolestima, CROCMID, (Poreč, 20. - 23. listopada 2016.)
28. Tomić Paradžik M, Dokuzović G, Drenjančević D, Talapko J. *Sarcoptes scabiei* – novi uzlet zanemarenog patogena, knjiga sažetaka: 2. međunarodni kongres palijativne skrbi, (Slavonski Brod, 5. – 6. svibnja 2017.)
29. Talapko J, Drenjančević D,Tomić Paradžik M. Biofilm – značaj i metode detekcije. Laboratorijska i klinička medicina – teorija, inovacija i praksa, kniga sažetaka: 7. hrvatski kongres laboratorijske dijagnostike, (Poreč, 27. rujna – 1. listopada 2017.)
30. Bedenić B, Slade M, Žele-Starčević L, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujić Atalić V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić Paradžik M, et. al. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. 28th ECCMID, (Madrid, Espana, 21. – 24. travnja 2018.)
31. Tomić Paradžik M, Drenjančević D, Stanko-Presečki A, Kopić J, Talapko J, Zarfel G, Ladavac M, Bedenić B. Hidden carbapenem resistance in OXA-48 and ESBL positive *Escherichia coli*. 29th ECCMID, (Amsterdan, Netherland, 12. – 16. travnja 2019.).

GODIŠNJE PUBLIKACIJE

1. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u republici Hrvatskoj. Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH. Izdanja 2010., 2011., 2012., 2013., 2014., 2015., 2016. i 2017. godine. Izdavač: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske.

POZVANA PREDAVANJA NA TEČAJEVIMA 1. KATEGORIJE

1. Tomić Paradžik M. Liječenje kandidemije u OB „Dr J. Benčević“ u Slavonskom Brodu, knjiga sažetaka: Poslijediplomski tečaj 1.kategorije „Suvremeni pristup dijagnostici i terapiji sustavnih mikoza“, Zagreb, 19. – 20. ožujka 2009.
2. Tomić Paradžik M. Nadzor nad MRSA u JIL-u – petogodišnje iskustvo, knjiga sažetaka: 5. kongres hrvatskog društva za anesteziologiju i intenzivno liječenje, Osijek, 22. – 24. travnja 2010.
3. Tomić Paradžik M. Kontrola bolničkih infekcija u JIL-u. 1. Tečaj mehaničke ventilacije bolesnika za medicinske sestre i tehničare, Slavonski Brod, 4. studenoga 2017.
4. Tomić Paradžik M. Kontrola bolničkih infekcija u JIL-u. 2. Tečaj mehaničke ventilacije bolesnika za medicinske sestre i tehničare, Slavonski Brod, 24. studenoga 2018.
5. Tomić Paradžik M. Infekcije pacijenata na mehaničkoj ventilaciji. III. tečaj mehaničke ventilacije bolesnika za liječnike, Slavonski Brod, 7. – 9. ožujka 2019.