

Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnih enterobakterija

Madunović, Stipe

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:152:422733>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINA

Stipe Madunović

ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST

KARBAPENEM REZISTENTNIH

ENTEROBAKTERIJA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I

DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINA

Stipe Madunović

ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST

KARBAPENEM REZISTENTNIH

ENTEROBAKTERIJA

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren na Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević, dr. med.

Rad ima 36 stranica, 6 tablica i 2 slike.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bakterijska rezistencija na karbapeneme	1
1.1.1. Karbapenemi	2
1.1.2. Mehanizmi bakterijske rezistencije na karbapeneme	3
1.2. Karbapenem rezistentne enterobakterije.....	4
1.2.1. Epidemiologija karbapenem rezistentnih enterobakterija u svijetu	6
1.2.2. Epidemiologija karbapenem rezistentnih enterobakterija u Hrvatskoj.....	7
1.3. Antimikrobna terapija infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim enterobakterijama	7
1.3.1. Prenamjena starih antibiotika.....	8
1.3.2. Razvoj novih antibiotika i inhibitora β -laktamaza.....	9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Ustroj studije.....	11
3.2. Materijali.....	11
3.3. Metode	11
3.3.1. Izolacija, identifikacija i testiranje osjetljivosti bakterija na antibiotike	11
3.3.2. Detekcija i identifikacija karbapenemaza	12
3.4. Statističke metode.....	12
4. REZULTATI.....	13
4.1. Bakterijski izolati.....	13
4.2. Uzorci	14
4.3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme.....	15
4.4. Antimikrobna osjetljivost	16
4.4.1. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentne <i>K. pneumoniae</i>	18
4.4.2. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnog <i>E. cloacae</i>	18
4.4.3. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnih <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. coli</i> i <i>K. oxytoca</i>	19

5. RASPRAVA.....	20
4.1. Bakterijski izolati.....	20
4.2. Uzorci	21
4.3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme	22
4.4. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnih enterobakterija	23
6. ZAKLJUČAK	26
7. SAŽETAK.....	27
8. SUMMARY	28
9. LITERATURA.....	29
10. ŽIVOTOPIS	36

POPIS KRATICA

AmpC – engl. *ampicillinase C*

CRE – karbapenem rezistentne enterobakterije (prema engl. *carbapenem-resistant Enterobacterales*)

CTX-M – engl. *Cefotaxime-Munich*

ESBL – β -laktamaze proširenog spektra (prema engl. *Extended Spectrum β -lactamase*)

GES – engl. *Guiana extended spectrum*

GIM – engl. *German imipenemase*

IMI – engl. *Imipenem-hydrolyzing β -lactamase*

IMP – engl. *Imipenemase*

KPC – engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

NDM – engl. *New Delhi metallo- β -lactamase*

NMC – engl. *Non-metallo-carbapenemase*

OXA – engl. *oxacillinase*

PBP – protein koji veže penicilin (prema engl. *penicillin binding protein*)

SHV – engl. *Sulphydryl reagent variable*

SIM – engl. *Seul imipenemase*

SME – engl. *Serratia marcescens enzyme*

SPM – engl. *Sao Paulo metallo- β -lactamase*

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TEM – od Temoniera

VIM – engl. *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*

1. UVOD

U području istraživanja i praćenja bakterijske rezistencije na antibiotike jedno od najznačajnijih mjesta zauzimaju karbapenem rezistentne enterobakterije. Široko su rasprostranjene u cijelome svijetu, a posljednjih je godina sve veći broj opisanih karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* (1). Štoviše, SZO objavila je popis bakterija za koje su hitno potrebni novi antibiotici, a karbapenem rezistentne enterobakterije svrstane su među patogene najviše razine prioriteta pod nazivom “kritično” (2). Razvoj bakterijske rezistencije na antibiotike prirodan je proces, ali značajno pod utjecajem izloženosti antibioticima. Iako je uvjet pojačane izloženosti antibioticima zadovoljen kod mnogih stanovnika zemalja u kojima se antibiotici neprimjerenom primjenjuju i koriste, opasnost rezistencije najizraženija je u hospitaliziranih pacijenata koji su tijekom boravka u bolničkim centrima često izloženi agresivnim terapijama i invazivnim metodama liječenja koje narušavaju sustave obrane od patogena. Jedna od glavnih karakteristika ove populacije oslabljenost je otpornosti organizma koja omogućava oportunističkim bakterijama da izazovu širok spektar teških infekcija (3). Kada dođe do razvoja infekcije rezistentnim patogenom, suženost izbora antimikrobne terapije dovodi do složenosti preporuka za liječenje, porasta učestalosti komplikacija koje produljuju hospitalizaciju i povećane smrtnosti (4 – 6). Osim interakcijama između samih bakterija, širenje rezistencije potaknuto je neodgovarajućom provedbom postupaka asepse te cirkulacijom pacijenata između različitih zdravstvenih ustanova i okruženja poput smještaja za dugoročnu skrb, kao i između različitih odjela unutar iste ustanove (7, 8). Također, na globalnoj razini posebnu važnost imaju putovanja u endemske krajeve i primanje medicinske skrbi u tim područjima (6). Ozbiljnost rezistencije na antibiotike prepoznala je SZO svrstavajući je među deset najvećih prijetnji ljudskom zdravlju 21. stoljeća (9).

1.1. Bakterijska rezistencija na karbapeneme

Suvremenu medicinu nemoguće je zamisliti bez primjene antibiotika u liječenju bakterijskih infekcija. Od njihovog otkrića do danas, zbog niske toksičnosti i visoke učinkovitosti u antimikrobnoj terapiji raznih infekcija, najčešće se koriste β -laktamski antibiotici (10). Stečena bakterijska rezistencija na antibiotike prisutna je od samih početaka njihove primjene, a svojim širenjem postaje sve veći globalni problem. Isto vrijedi i za β -laktame čija važnost uvjetuje posebnu zabrinutost. Pozornost zdravstvenih sustava i farmaceutskih industrija, usmjerena na meticilin-rezistentne stafilokoke (MRSA) i

vankomicin-rezistentne enterokoke (VRE), početkom 21. stoljeća preusmjerava se na širenje rezistentnih gram-negativnih bakterija koje danas obilježava visok stupanj rezistencije na većinu β -laktama i sve viši stupanj rezistencije na karbapeneme (11, 12). U kontekstu rezistentnih gram-negativnih bakterija najčešće se govori o rezistentnim vrstama rodova *Pseudomonas* i *Acinetobacter* te o rezistentnim enterobakterijama. Iste se, s obzirom na to da su često rezistentne na veći broj antibiotika koji nisu međusobno slični, nazivaju i multirezistentnim gram-negativnim bakterijama (11, 13).

1.1.1. Karbapenemi

Iako se primjena penicilina u kliničkoj praksi bilježi od 1940. godine, njegova uloga u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama porasla je tek krajem 1950-ih razvojem aminopenicilina (14). Nedugo nakon toga pokazalo se da je primjena ampicilina ograničena jer su među gram-negativnim vrstama otkrivene β -laktamaze poput TEM-1 i SHV-1 (15). Privremeno rješenje pronašlo se razvojem cefalosporina proširenog spektra, odnosno cefalosporina treće generacije (16). Budući da je na njihovo djelovanje većina gram-negativnih bakterija bila osjetljiva, početkom 1980-ih predstavljeni su kao antibiotici iznimne učinkovitosti. Prvi uočeni mehanizam rezistencije na cefalosporine treće generacije bila je proizvodnja kromosomskih AmpC β -laktamaza koje su se ubrzo mobilizirale na plazmide (17). Istovremeno dolazi do otkrivanja β -laktamaza proširenog spektra (ESBL), najprije mutiranih varijanti enzima SHV i TEM, a nakon toga i CTX-M, β -laktamaze porijeklom iz klinički beznačajnog roda *Kluyvera* (15, 17). Širenje ESBL sojeva gram-negativnih bakterija, koje i danas traje, te njihova sklonost kontinuiranom širenju svoga spektra rezistencije potaknuli su primjenu karbapenema, antibiotika najšireg spektra djelovanja od do danas poznatih. Karbapenemi su polusintetički derivati tienamicina, potentnog prirodnog antibiotika. Stabilnost prema β -laktamazama posljedica je stereokemije njihovog postraničnog lanca. Naime, za razliku od većine ostalih β -laktama, karbapenemi nemaju atom sumpora u bicikličkoj jezgri, imaju hidroksietilnu skupinu na položaju 6 te transkonfiguraciju između pozicija 5 i 6 (18). Kao prvi karbapenem, imipenem je u kliničku primjenu uveden 1985. godine (17). Zbog podložnosti hidrolizi bubrežnom peptidazom, primjenjuje se s cilastatinom, inhibitorom enzima. Stabilniji meropenem u kliničku primjenu uveden je deset godina kasnije, a nakon toga uslijedila je i pojava ertapenema te doripenema (19). Karbapenemi se slabo apsorbiraju gastrointestinalnim putem, te su zato dostupni u obliku pripravaka za parenteralnu primjenu. Svi se izlučuju renalnom ekskrecijom, a njihov

sigurnosni profil sličan je profilu penicilina i cefalosporina. Stoga su i najčešće nuspojave slične nuspojavama drugih β -laktama, a uključuju probavne smetnje i alergijske reakcije (18, 20). Mehanizam kojim karbapenemi postižu svoj učinak temelji se na njihovoj interferenciji sa sintezom bakterijske stanične stijenke. Poput ostalih β -laktama, vežu se za enzime koji reguliraju umrežavanje sastavnica peptidoglikana (PBP) te ih tako inhibiraju i posljedično narušavaju funkciju stijenke u održavanju osmotskog gradijenta između stanice i okoline, što rezultira smrću bakterije. Unutar takvog djelovanja pojedini se karbapenemi razlikuju u farmakodinamičkim svojstvima, ali svima im je zajedničko da imaju visok afinitet vezanja za PBP, da lako prolaze kroz porinske kanale vanjske membrane gram-negativnih bakterija te da su otporni na hidrolizu ESBL enzimima i AmpC β -laktamazama (18, 21).

1.1.2. Mehanizmi bakterijske rezistencije na karbapeneme

Glavni mehanizmi bakterijske rezistencije na karbapeneme su proizvodnja karbapenemaza, hiperprodukcija efluks pumpi i smanjenje propusnosti vanjske membrane (22). Karbapenemaze su β -laktamaze koje širinom svoga spektra hidroliziraju i karbapeneme (23). Treba naglasiti da je riječ o skupini strukturno i funkcionalno različitih enzima, te da zbog toga njihov hidrolitički spektar nije jedinstven. Drugim riječima, djelovanje karbapenemaza varira između pojedinih vrsta, a iste pokazuju i različitu aktivnost prema pojedinim β -laktamima. Osim toga, produkcija karbapenemaza nerijetko je u istog bakterijskog soja udružena s drugim mehanizmima rezistencije, iz čega proizlazi da je rezistencija na karbapeneme pojava kompleksnija od interakcije karbapenemaza s karbapenemima (24, 25). Iako se β -laktamaze preciznije klasificiraju na temelju funkcionalnih karakteristika, zbog jednostavnosti se češće razvrstavaju prema njihovoj molekularnoj strukturi. Najpoznatija takva podjela Amblerova je klasifikacija prema kojoj se karbapenemaze nalaze u grupama A, B i D (26). Najznačajnije porodice karbapenemaza grupe A su NMC, SME, IMI, KPC i GES. Učinkovito hidroliziraju širok spektar penicilina, cefalosporina, karbapenema i aztreonam. Od ostalih karbapenemaza razlikuju se po tome što ih inhibira klavulanska kiselina te u određenoj mjeri tazobaktam (27, 28). Kako je i opisano u dijelu o epidemiologiji CRE u svijetu, KPC ima veliki potencijal epidemijskog širenja, stoga je klinički najznačajnija karbapenemaza grupe A (29). Karbapenemaze grupe B poznatije su kao metalo- β -laktamaze, a pripadaju IMP, VIM, SIM, SPM, GIM i NDM porodicama (30). Osnovu mehanizma kojim inhibiraju β -laktame čine atomi cinka koji se nalaze u njihovom aktivnom mjestu, čime je određena njihova osjetljivost na inhibiciju metalnim kelatorima

(31). Metalo- β -laktamaze hidroliziraju sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme. Njihovu hidrolitičku aktivnost ne inhibira klavulanska kiselina, ali inhibira ih aztreonam čiji inhibitorni učinak često izostaje zbog dodatne produkcije ESBL enzima (32). Većina karbapenemaza grupe D pripada velikoj skupini oksacilinaza (OXA) koje u usporedbi s ostalim karbapenemazama imaju slabiju aktivnost prema karbapenemima. Iako hidroliziraju peniciline, OXA karbapenemaze uglavnom ne djeluju na cefalosporine proširenog spektra, pa je rezistencija na njih izražena samo ako je prisutna slabija propusnost vanjske membrane ili ako bakterije dodatno produciraju ESBL ili AmpC β -laktamazu (28, 33). S enterobakterijama najčešće se povezuje OXA-48 karbapenemaza, a za sve OXA karbapenemaze karakteristično je da ih klavulanska kiselina, sulbaktam ili tazobaktam ne inhibiraju (34). Hiperprodukcijom efluks pumpi bakterije smanjuju koncentraciju antibiotika unutar stanice njihovom pojačanom eliminacijom. Najopisivanija efluks pumpa u enterobakterija je AcrAB-TolC, sustav koji omogućava razvoj rezistencije na širok spektar antibiotika, uključujući i različite β -laktamske spojeve (35). Transmembranski proteini specifičnog i nespecifičnog djelovanja prožimaju vanjsku membranu gram-negativnih bakterija, a konsenzusom se skupno nazivaju porinima. Mutacije gena koji kodiraju proteine porinskih kanala mogu dovesti do djelomičnog gubitka njihove funkcije ili do njihovog potpunog uklanjanja. Rezultat je smanjena propusnost vanjske membrane, što također predstavlja mehanizam rezistencije jer dolazi do razvoja slabije penetracije antibiotika u bakterijsku stanicu (36). Osim navedenih mehanizama, i produkcija ESBL enzima i AmpC β -laktamaza, u slučaju smanjene koncentracije karbapenema, može se smatrati mehanizmom rezistencije koji ne uključuje proizvodnju karbapenemaza. Unatoč tome što ovi enzimi ne hidroliziraju karbapeneme, imaju sposobnost vezanja njihovih molekula, što rezultira sprječavanjem karbapenema u ostvarivanju učinka na bakterijsku stanicu (37, 38).

1.2. Karbapenem rezistentne enterobakterije

Imenom *Enterobacterales* obilježava se veliki red gram-negativnih štapića koji su rasprostranjeni u tlu, vodi, na biljkama te u probavnom sustavu ljudi i životinja. U čovjekovim crijevima normalno čine 1 – 2 % ukupne mikrobiote, a uzročnici infekcija u ljudi nalaze se u tri porodice: *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae* i *Morganellaceae* (18). Unutar svake od navedenih porodica pronađene su bakterije rezistentne na barem jedan lijek iz skupine karbapenema, što ih ujedno čini karbapenem rezistentnim enterobakterijama (39). Rod *Klebsiella* obuhvaća vrste od kojih su neke primarni patogeni, a neke komenzali i

oportunistički patogeni. Jednostavno se izoliraju i imaju jednostavne zahtjeve za rast. Klepsijele su nepokretne, imaju dobro razvijenu kapsulu te stvaraju endotoksin kao i ostale gram-negativne bakterije. *Klebsiella pneumoniae* najčešće od svih klepsijela uzrokuje infekcije u ljudi. Može biti primarni patogen kao uzročnik nekrotizirajuće pneumonije ili infekcija mokraćnog sustava. Kao oportunistički patogen pojavljuje se u uvjetima oslabljene otpornosti zbog nekog drugog stanja te uzrokuje pneumoniju, uroinfekcije, postoperativne infekcije, sepsu i meningitis (18). Sojevi *Enterobacter cloacae* česti su kontaminanti različitih medicinskih predmeta i instrumenata, pa se tim putem prenose na pacijente u bolničkim sredinama. *E. cloacae* pokretna je bakterija i kao ostale enterobakterije na katalazu pozitivna, a na oksidazu negativna. Dio je normalne crijevne flore, a u slučaju oslabljene otpornosti može uzrokovati pneumoniju, infekcije mokraćnih puteva, sepsu te infekcije povezane s intravaskularnim kateterima (18). Od svih vrsta roda *Providencia*, sojevi *Providencia stuartii* najčešće se izoliraju iz kliničkih uzoraka. Iako se kao uzročnici infekcija od ostalih enterobakterija ne razlikuju mnogo, izdvajaju se prema sposobnosti deaminacije aminokiselina fenilalanina i lizina. *P. stuartii* pokretna je putem bičeva i za razliku od ostalih navedenih enterobakterija ne fermentira laktozu. Uglavnom uzrokuje bolničke uroinfekcije koje su najčešće endogene ili su povezane s urinarnim kateterima, pa se prevencija, između ostalog, temelji na izbjegavanju katetera kad god je to moguće (18). *Serratia marcescens* oportunistički je patogen u ljudi. Riječ je o pokretnoj, katalaza-pozitivnoj bakteriji za koju je karakteristična mogućnost hidrolize kazeina, koja ima ulogu u stvaranju interakcija s izvanstaničnim matriksom. Također, neki sojevi proizvode crveni pigment, a obilježje svih vrsta iz roda *Serratia* posjedovanje je enzima lipaze, želatinaze i DNA-aze koje druge enterobakterije nemaju. U bolničkim sredinama sojevi *S. marcescens* često kontaminiraju različite površine i tekućine, a u hospitaliziranih bolesnika mogu biti uzročnici infekcija mokraćnog sustava, infekcije rane i bakterijemije (18, 40). *Escherichia coli* za čovjeka je najčešća i najznačajnija vrsta roda *Escherichia* te općenito najčešći uzročnik infekcija od svih enterobakterija. Iz primarno sterilnih uzoraka na obogaćenim podlogama izolira se lako, a ako je riječ o primarno nesterilnom uzorku potrebno je koristiti se selektivnim podlogama. Većina sojeva je pokretna, mnogi imaju fimbrije, a neki sojevi i razvijenu kapsulu. Traumom ili kirurškim zahvatom sojevi *E. coli* koji su dio normalne crijevne mikrobiote mogu biti uneseni u unutrašnjost organizma i putem općih čimbenika virulencije uzrokovati infekciju bilo kojeg organa. S druge strane, plazmidi koje posjeduju kod nekih sojeva određuju specifične čimbenike virulencije, pa tako unutar vrste razlikujemo i nekoliko patotipova *E. coli* koji su uzročnici dijarealnih infekcija, uroinfekcija ili novorođenačkog meningitisa (18).

1.2.1. Epidemiologija karbapenem rezistentnih enterobakterija u svijetu

Među prvim opisanim CRE bili su sojevi *S. marcescens* izolirani iz kliničkih uzoraka u Japanu 1993. godine (41). Od tada do danas, a posebno posljednjih dvadeset godina, medicinske ustanove u svim dijelovima svijeta sve učestalije detektiraju sojeve CRE koje u istima nerijetko uzrokuju epidemije različitih razmjera. S obzirom na to da je glavni razlog rezistencije na karbapeneme stvaranje karbapenemaza i da se određene porodice karbapenemaza češće pojavljuju u određenim dijelovima svijeta, praktično je epidemiološku sliku u svijetu razmotriti prema najzastupljenijim karbapenemazama. Naime, na globalnoj su razini tri porodice karbapenemaza trenutačno glavni uzročnici rezistencije na karbapeneme u enterobakterija: KPC, NDM i OXA-48. Pored navedenih, epidemiološki značajne, a ujedno i starije porodice karbapenemaza, su i IMP te VIM. Spomenuti sojevi *S. marcescens* u Japanu su 1993. godine rezistentni na karbapeneme bili upravo zbog stvaranja IMP koja je ondje i na Tajvanu zadržala endemski karakter (42). Iako je VIM prvi puta otkrivena u sojeva *P. aeruginosa* 1997. godine u Italiji, kroz nekoliko idućih godina u više su europskih zemalja opisane enterobakterije koje proizvode VIM, a kao epicentar VIM-producirajućih enterobakterija ističe se Grčka (31, 43). U SAD-u je u izolata *K. pneumoniae* 1996. godine prvi puta opisana KPC karbapenemaza koja se od većine ranije opisanih karbapenemaza grupe A razlikuje po tome što je kodirana plazmidno, a ne kromosomalno. Lokalizacija gena koji kodira KPC karbapenemazu, dakle, omogućava njegovo horizontalno širenje i velik potencijal za razvoj epidemije. Doista, *K. pneumoniae* koja proizvodi KPC idućih se desetak godina proširila diljem SAD-a, a širenje je zabilježeno i u Izraelu, Grčkoj, Velikoj Britaniji, Poljskoj te do danas u gotovo svim ostalim europskim zemljama (44). Pojava OXA-48 karbapenemaze prvi je puta zabilježena u Turskoj 2003. godine, a iako je rasprostranjena u cijeloj Europi, na svjetskoj se razini Bliski istok i sjever Afrike i danas smatraju primarnim rezervoarom za njezino širenje. Plazmid na kojem se nalazi gen za OXA-48 izrazito je konjugativan, ali specifičan i po tome što osim gena za OXA-48 ne nosi gene za ostale enzime rezistencije. Time je, uz spomenutu slabiju karbapenemaznu aktivnost, definirano i njezino suptilnije djelovanje u odnosu na ostale karbapenemaze (45, 46). Do 2008. godine, kada je u Švedskoj opisan NDM pozitivni izolat *K. pneumoniae*, karbapenemaze porodice NDM bile su ograničene na indijski potkontinent (47). Kao i KPC i OXA-48, kodirane su plazmidno, stoga ne čudi da se NDM-1 karbapenemaza u samo nekoliko godina proširila diljem Europe i SAD-a. Također, NDM-producirajuće enterobakterije često su multirezistentne jer plazmid

koji sadržava NDM gen može imati više determinanti rezistencije, što predstavlja veliki terapijski problem (18).

1.2.2. Epidemiologija karbapenem rezistentnih enterobakterija u Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj praćenje rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini započelo je 1996. godine kada je Odboru za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike podatke podnijelo 17 centara. Do 2021. godine broj centara narastao je na 39 čime je obuhvaćeno preko 90 % populacije. Svake godine Akademija medicinskih znanosti objavljuje obrađene podatke među kojima se nalaze i podaci o rezistenciji sojeva *K. pneumoniae* na karbapeneme. Od 2014. godine, kada je broj klepsijela rezistentnih na karbapeneme dosegao razinu vidljivu kao postotak rezistencije na imipenem i meropenem (1%), stope rezistencije dramatično su porasle i 2021. godine iznose 21 % za ertapenem, 8 % za imipenem i 14 % za meropenem. Podatak značajan za ovo istraživanje je i taj da je stopa rezistencije *K. pneumoniae* na ceftazidim-avibaktam još uvijek niska i iznosi 1 %. Iste godine nije zabilježena rezistencija *E. coli* na karbapeneme, a u rodovima *Enterobacter*, *Citrobacter* i *Serratia* bilo je 6 % sojeva rezistentnih na ertapenem i po 1 % rezistentnih na imipenem i meropenem (48). Prvi izolirani soj karbapenem rezistentnih enterobakterija u Hrvatskoj bila je NDM-1-producirajuća *K. pneumoniae* opisana 2009. godine, a dvije godine kasnije u Hrvatskoj je zabilježena i *K. pneumoniae* koja proizvodi KPC. Uslijed primijećenog značajnog porasta broja izolata rezistentnih na karbapeneme, 2012. godine provedena su istraživanja koja su među karbapenem rezistentnim enterobakterijama pokazala dominaciju VIM karbapenemaza (49). Iste godine zabilježena je i pojava OXA-48, a u nekoliko idućih godina i veliki porast udjela OXA-48-pozitivnih enterobakterija među CRE. Ono što posebno zabrinjava je to da je analiza izolata iz razdoblja od 2015. do 2017. godine pokazala da CRE koje proizvode OXA-48 nisu proširene samo u velikim bolničkim centrima, nego i u manjim ustanovama u rubnim područjima Hrvatske (50).

1.3. Antimikrobna terapija infekcija uzrokovanih karbapenem rezistentnim enterobakterijama

Najčešće infekcije kod kojih je indicirano liječenje karbapenemima su teška pneumonija, koja uključuje bolničku pneumoniju i pneumoniju uzrokovanu mehaničkom ventilacijom pluća, komplicirane infekcije mokraćnog sustava, komplicirane

intraabdominalne infekcije te komplicirane infekcije kože i mekih tkiva. Također, koriste se i u terapiji bolesnika s febrilnom neutropenijom ili bakterijemijom koje su povezane s nekim od navedenih stanja (51). S obzirom na razvoj rezistencije na karbapeneme, za takve je indikacije nužno razvijati alternativne opcije kao osnove novih empirijskih terapija. Takve osnove mogu biti lijekovi koji su u primjenu ušli prije širenja rezistencije na karbapeneme, a čije se djelovanje pokazalo učinkovitim protiv CRE. Međutim, uzimajući u obzir to da se godinama primjenjuju i za druge indikacije, rezistencija je u određenoj mjeri na mnoge od njih zasigurno već prisutna, te se stoga, kao što je ranije spomenuto, potrebno hitno angažirati na području razvoja novih antibiotika (2). Također, značajan pristup u liječenju spomenutih infekcija kombinirana je antimikrobna terapija. Naime, primjenom više različitih antibiotika pretpostavlja se da je povećana vjerojatnost da će barem jedan biti djelotvoran, da će doći do sinergizma između lijekova te da će se smanjiti vjerojatnost nastanka rezistencije. Međutim, do danas provedenim istraživanjima nije uspostavljen širok konsenzus o prednostima i manama ovakvog pristupa. Jasno je da pogrešna empirijska terapija pogoršava klinički ishod, ali dokaza o sinergističkom učinku i smanjenju nastanka rezistencije nema dovoljno za izradu fiksnih terapijskih obrazaca. Štoviše, za primjenu dodatnog antibiotika vrijedi i obrnuto jer se njome otvara mogućnost razvoja dodatne rezistencije, ali i činjenica da je potencijalno štetna jer svaki lijek može uzrokovati svoje nuspojave (52). Stoga se ovdje, iako odbori u različitim dijelovima svijeta kontinuirano objavljuju smjernice za liječenje infekcija uzrokovanih CRE, antibiotici koji su komponente različitih terapijskih pristupa prikazuju zasebno, izvan specifičnih obrazaca.

1.3.1. Prenamjena starih antibiotika

U novije su vrijeme sukladno svojoj učinkovitosti u terapiju infekcija uzrokovanih CRE uključeni stari antibiotici kao što su kolistin, fosfomicin, amikacin i tigeciklin. Nakon što je u prošlom stoljeću zbog nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti bio ograničen na lokalnu primjenu, kolistin (polimiksin E) u posljednjih dvadeset godina postaje jedan od glavnih lijekova u liječenju infekcija uzrokovanih CRE. Pripada skupini cikličkih polipeptidnih antibiotika, a djeluje tako da se veže na bakterijsku citoplazmatsku membranu i narušava njezinu funkciju aktivnog transporta (18). Novija istraživanja pokazuju da nije toliko toksičan kako se nekad smatralo, a rizik od teških nuspojava može se smanjiti inhalacijskom primjenom (53). Fosfomicin je antibiotik koji baktericidni učinak postiže inhibicijom sinteze bakterijske stijenke, a jedinstveno mjesto vezanja osigurava izostanak križne rezistencije s

drugim antibioticima. Njegova peroralna primjena česta je u liječenju nekompliranih uroinfekcija, a parenteralna primjena zastupljena je u liječenju prethodno navedenih infekcija. Odlikuje ga dobar sigurnosni profil, nije toksičan, a najčešće nuspojave uključuju poremećaje probavnog sustava (54). U liječenju infekcija uzrokovanih CRE aminoglikozidi još uvijek imaju ulogu, a ukoliko je prisutna rezistencija na ostale, u primjeni je najučinkovitiji amikacin. I aminoglikozidi i tetraciklini učinak ostvaruju inhibicijom sinteze proteina vežući se za aktivna mjesta na bakterijskim ribosomima. Tigeciklin pripada skupini glicilciklina, sintetičkih analoga tetraciklina koji se za ribosome vežu jačim afinitetom, pa djeluju i na mnoge bakterije rezistentne na tetracikline, između ostalih i na neke enterobakterije (18). Nuspojave amikacina većinom su posljedica neželjenih učinaka aminoglikozida, među kojima je ototoksičnost najozbiljnija. Isto tako, spektar nuspojava tigeciklina sličan je onom u tetraciklina, a uključuje opće gastrointestinalne simptome, fotosenzibilnost te hepatotoksičnost (18, 54).

1.3.2. Razvoj novih antibiotika i inhibitora β -laktamaza

U razvoju antibiotika sa širim spektrom djelovanja od postojećih posljednjih godina nema značajnog napretka, ali razvijaju se inhibitori β -laktamaza koji imaju sposobnost inhibicije karbapenemaza. Novi lijekovi stoga su često fiksna kombinacija β -laktama i inhibitora β -laktamaza. β -laktami koji su komponente tih kombinacija su cefalosporini treće generacije ili karbapenemi, a novi inhibitori β -laktamaza u primjeni su avibaktam, vaborbaktam i relebaktam. Navedeni se razlikuju u spektru inhibicije, pa tako avibaktam inhibira karbapenemaze grupe A i D, a vaborbaktam i relebaktam karbapenemaza grupe A (55). Stoga enterobakterije koje proizvode karbapenemaze grupe B mogu biti rezistentne na kombinacije koje uključuju sva tri nova inhibitora β -laktamaza, a one koje proizvode karbapenemaze grupe D mogu biti rezistentne na kombinacije koje sadrže vaborbaktam ili relebaktam. Cefiderokol novi je cefalosporin odobren za korištenje u terapiji infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama 2020. godine, a specifično djelovanje omogućuje mu katekolski dio koji hvatajući željezo djeluje kao siderofora. Takvim spojem ostvaruje stabilnost protiv širokog spektra karbapenemaza, a u stanicu gram-negativnih bakterija ulazi preko kanala za transport željeza čime zaobilazi ometanje efluks pumpama i mutacijama porina. U *in vitro* studijama pokazao se kao lijek s iznimno učinkovitim djelovanjem protiv širokog spektra gram-negativnih bakterija, a u kliničkim ispitivanjima kao djelotvoran u terapiji mnogih infekcija, u čijem je liječenju često indicirana primjena karbapenema (18).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati učestalost karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* u 2021. i 2022. godini u KBC-u Osijek.
2. Ispitati učestalost proizvodnje pojedinih vrsta karbapenemaza među karbapenem rezistentnim vrstama reda *Enterobacterales* izoliranih iz kliničkih uzoraka pacijenata hospitaliziranih u KBC-u Osijek.
3. Ispitati antimikrobnu osjetljivost karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* izoliranih iz kliničkih uzoraka hospitaliziranih pacijenata u KBC-u Osijek.
4. Ispitati trendove i razlike u osjetljivosti karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* na pojedine antibiotike.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao presječno istraživanje s povijesnim podacima (56).

3.2. Materijali

U ovom istraživanju analizirani su podaci o uzorcima poslanima na mikrobiološku obradu, koji su uzeti pacijentima hospitaliziranim u Kliničkom bolničkom centru Osijek u dvogodišnjem razdoblju, od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2022. godine. Podaci o uzorcima i izoliranim bakterijama te rezultatima testiranja osjetljivosti na antimikrobne kemoterapeutike dobiveni su iz arhivske i elektroničke baze podataka Kliničkog bolničkog centra Osijek (*uBIS, In2, Hrvatska*).

3.3. Metode

Identifikacija, testiranje osjetljivosti i detekcija karbapenemaza provedena je na izolatima smanjene osjetljivosti na karbapeneme u početnoj mikrobiološkoj obradi, odnosno na suspektnim izolatima enterobakterija smanjene osjetljivosti na karbapeneme, utvrđene disk-difuzijskom metodom prema EUCAST metodologiji (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, <https://www.eucast.org>*), a za koje je ponovljenim testiranjem utvrđena rezistencija na ertapenem.

3.3.1. Izolacija, identifikacija i testiranje osjetljivosti bakterija na antibiotike

Izolacija, identifikacija i testiranje osjetljivosti bakterija na antimikrobne kemoterapeutike provedeni su standardnim postupcima sukladno pravilima struke. U identifikaciji bakterijskih vrsta korišten je MALDI-TOF maseni spektrometar (*Ultraflex, Bruker, Njemačka*) uz MALDI Bruker Biotyper bazu uz komplementarne standardne fenotipske metode, uključivo i automatiziranu IVD komercijaliziranu platformu za identifikaciju i testiranje osjetljivosti na antibiotike BD Phoenix M50 (*Becton, Dickson and Co, SAD*).

U testiranju osjetljivosti korištena je i standardizirana disk-difuzijska metoda po Kirby-Baueru te e-test metoda (*bioMerieux, Francuska*) prema smjernicama EUCAST-a, sukladno kriterijima za interpretaciju osjetljivosti na antibiotike. U ovom istraživanju osjetljivost izolata testirana je na sljedeće antibiotike: imipenem, meropenem, kolistin, fosfomicin, tigeciklin, amikacin, ceftazidim-avibaktam te dodatno na imipenem-relebaktam i cefiderokol u izolata iz 2022. godine.

3.3.2. Detekcija i identifikacija karbapenemaza

Detekcija karbapenemaza te njihova identifikacija obavljena su pomoću komercijalnog imunokromatografskog testa RESIST-% O.K.N.V.I. (*Coris Bioconcept, Belgija*). Test je dizajniran na način da se očitavanjem dokaže prisutnost klinički najznačajnijih karbapenemaza, odnosno OXA-48, KPC, NDM, VIM i IMP karbapenemaze.

3.4. Statističke metode

Kategorijski podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za analizu podataka korišteni su statistički programi MedCalc® Statistical Software version 20.218 (*MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://medcalc.org>; 2023*) i IBM SPSS 23 (*IBM Corp. Released 2015. Armonk, NY: IBM Corp.*).

4. REZULTATI

4.1. Bakterijski izolati

Istraživanje je provedeno na ukupno 128 uzoraka poslanih na mikrobiološku obradu, od kojih je 38 (29,7 %) iz 2021. i 90 (70,3 %) iz 2022. godine. Iz svakog uzorka izoliran je bakterijski soj rezistentan na ertapenem, odnosno karbapenem rezistentna enterobakterija (Tablica 1).

Tablica 1. Učestalost karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* u 2021. i 2022. godini

	Broj (%) uzoraka
Godina	
2021.	38 (29,7)
2022.	90 (70,3)

S obzirom na vrstu karbapenem rezistentne enterobakterije, u 110 (85,9 %) slučajeva radilo se o *K. pneumoniae*, u 10 (7,8 %) slučajeva o *E. cloacae*, dok su ostale vrste izolirane iz uzoraka u manjem broju. Nema značajnih razlika u raspodjeli vrsta izolata s obzirom na godine (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela karbapenem rezistentnih enterobakterija prema godinama

	Broj (%) izolata			<i>P</i> *
	2021.	2022.	Ukupno	
<i>K. pneumoniae</i>	33 (86,8)	77 (85,6)	110 (85,9)	0,79
<i>E. cloacae</i>	2 (5,3)	8 (8,9)	10 (7,8)	
<i>P. stuartii</i>	2 (5,3)	2 (2,2)	4 (3,1)	
<i>S. marcescens</i>	1 (2,6)	1 (1,1)	2 (1,6)	
<i>E. coli</i>	0	1 (1,1)	1 (0,8)	
<i>K. oxytoca</i>	0	1 (1,1)	1 (0,8)	

*Fisherov egzakti test

Najveći udio ESBL sojeva u obje promatrane godine prisutan je kod *K. pneumoniae* i *K. oxytoca*. U slučaju *K. pneumoniae* značajno je više ESBL sojeva u 2022. u odnosu na 2021. godinu (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$), dok kod ostalih vrsta nema značajnih razlika u raspodjeli prema godinama (Tablica 3).

Tablica 3. Raspodjela ESBL i ne-ESBL sojeva unutar pojedinih vrsta prema godinama

	Broj (%) izolata			<i>P</i> *
	2021.	2022.	Ukupno	
<i>K. pneumoniae</i>				
ESBL	12 (36,4)	69 (89,6)	81 (73,6)	< 0,001
ne-ESBL	21 (63,6)	8 (10,4)	29 (26,4)	
<i>E. cloacae</i>				
ESBL	0	5 / 8	5 / 10	0,44
ne-ESBL	2 / 2	3 / 8	5 / 10	
<i>P. stuartii</i>				
ESBL	0	2 / 2	2 / 2	0,33
ne-ESBL	2 / 2	0	2 / 2	
<i>S. marcescens</i>				
ESBL	0	0	0	-
ne-ESBL	1 / 1	1 / 1	2 / 2	
<i>E. coli</i>				
ESBL	0	0	0	-
ne-ESBL	0	1 / 1	1 / 1	
<i>K. oxytoca</i>				
ESBL	0	1 / 1	1 / 1	-
ne-ESBL	0	0	0	

*Fisherov egzaktni test

4.2. Uzorci

Uzorci iz kojih su izolirani ispitivani izolati obuhvaćaju dijagnostičke uzorke i nadzorne briseve. U 111 (86,7 %) slučajeva radilo se o dijagnostičkom uzorku, a u 17 (13,3 %) slučajeva o nadzornom brisu. Najučestaliji dijagnostički uzorci su urin u 54 (42,2 %)

slučaja, krv u 22 (17,2 %) slučaja, te aspirat traheje u 18 (14,1 %) slučaja. Najučestaliji nadzorni brisevi su bris ždrijela i bris perineuma. S obzirom na godine, nema značajnih razlika u raspodjeli vrsta uzoraka (Tablica 4).

Tablica 4. Raspodjela vrsta uzoraka prema godinama

Uzorak	Broj (%) uzoraka			P*
	2021.	2022.	Ukupno	
Dijagnostički uzorak	31 (81,6)	80 (88,9)	111 (86,7)	0,27
Nadzorni bris	7 (18,4)	10 (11,1)	17 (13,3)	
Vrsta dijagnostičkog uzorka				
urin	13 (34,2)	41 (45,6)	54 (42,2)	0,24
krv	6 (15,8)	16 (17,8)	22 (17,2)	0,79
aspirat traheje	6 (15,8)	12 (13,3)	18 (14,1)	0,72
bris rane	6 (15,8)	5 (5,6)	11 (8,6)	0,08
bris dekubitusa	0	2 (2,2)	2 (1,6)	> 0,99
ascites	0	2 (2,2)	2 (1,6)	> 0,99
iskašljaj	0	1 (1,1)	1 (0,8)	> 0,99
likvor	0	1 (1,1)	1 (0,8)	> 0,99
Vrsta nadzornog brisa				
bris ždrijela	2 (5,3)	4 (4,4)	6 (4,7)	> 0,99
bris perineuma	2 (5,3)	3 (3,3)	5 (3,9)	0,63
bris pazuha	2 (5,3)	0	2 (1,6)	0,09
bris prepone	0	2 (2,2)	2 (1,6)	> 0,99
bris rektuma	1 (2,6)	0	1 (0,8)	0,30
bris nosa	0	1 (1,1)	1 (0,8)	> 0,99

* χ^2 test i Fisherov egzaktni test

4.3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme

Najučestaliji mehanizam rezistencije proizvodnja je OXA-48 karbapenemaze u 104 (81,3 %) izolata. KPC karbapenemaza dokazana je u 7 (5,5 %) izolata, a u 12 (9,4 %) izolata

karbapenemaza nije dokazana. U jednog izolata detektirane su i NDM i OXA-48 karbapenemaza. Nema značajnih razlika u raspodjeli mehanizama rezistencije s obzirom na godine (Tablica 5).

Tablica 5. Raspodjela mehanizama rezistencije prema godinama

	Broj (%) izolata			<i>P</i> *
	2021.	2022.	Ukupno	
Mehanizam rezistencije				
OXA-48	31 (81,6)	73 (81,1)	104 (81,3)	0,95 [†]
KPC	3 (7,9)	4 (4,4)	7 (5,5)	0,42
NDM	0	3 (3,3)	3 (2,3)	0,55
VIM	0	1 (1,1)	1 (0,8)	> 0,99
NDM i OXA-48	0	1 (1,1)	1 (0,8)	> 0,99
Rezistencija bez dokazane karbapenemaze	4 (10,5)	8 (8,9)	12 (9,4)	0,75

*Fisherov egzakti test, [†] χ^2 test

4.4. Antimikrobna osjetljivost

Kod osjetljivosti svih karbapenem rezistentnih enterobakterija u 2021. godini osjetljivost je najveća na ceftazidim-avibaktam (94,4 %), a u 2022. na cefiderokol (96 %). U 2021. najveći je udio izolata rezistentnih na tigeciklin (85,7 %), a tijekom 2022. na meropenem (72,2 %). Nema značajnih razlika u osjetljivosti izolata prema godinama kod osjetljivosti na imipenem, meropenem, fosfomicin, amikacin i ceftazidim-avibaktam. Od ukupno 57 (44,5 %) izolata rezistentnih na kolistin, značajno je manje rezistentnih 2022. u odnosu na 2021. godinu (Fisherov egzakti test, $P = 0,02$). U slučaju osjetljivosti na tigeciklin, od ukupno 81 (64,8 %) rezistentnih izolata također je značajno manje rezistentnih u 2022. godini (Fisherov egzakti test, $P = 0,002$). Ispitivanje osjetljivosti na imipenem-relebaktam i cefiderokol provedeno je samo na izolatima iz 2022. godine (Tablica 6).

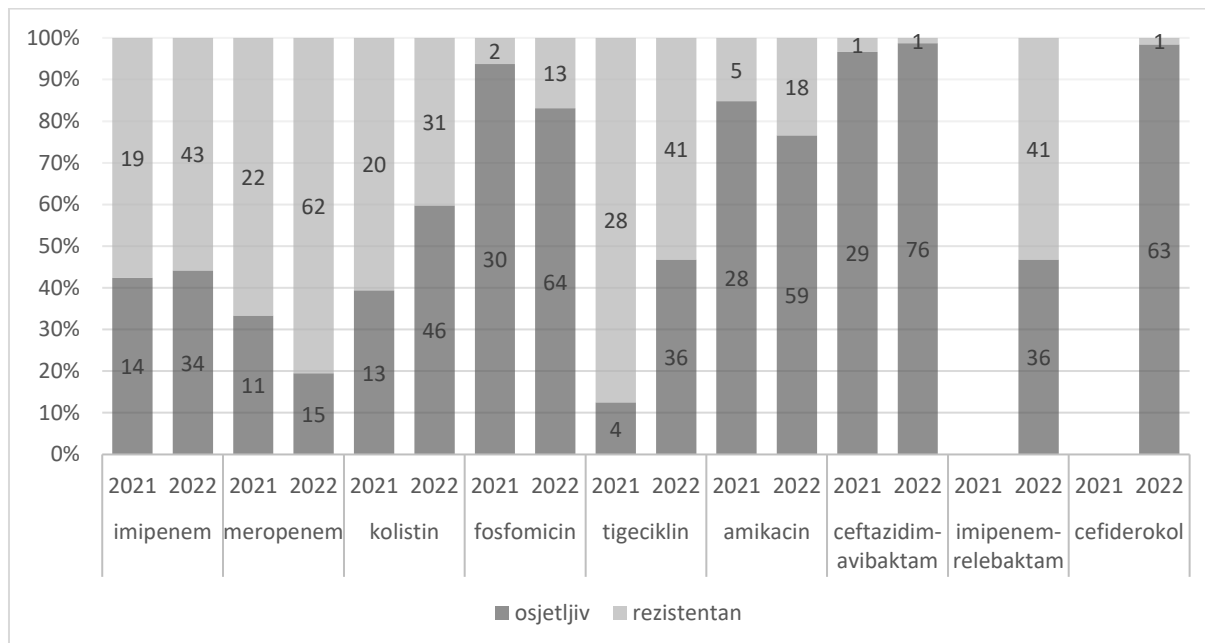
Tablica 6. Raspodjela osjetljivosti karbapenem rezistentnih enterobakterija prema godinama

	Broj (%) izolata			<i>P</i> *
	2021.	2022.	Ukupno	
Osjetljivost na imipenem				
Osjetljiv	16 (42,1)	43 (47,8)	59 (46,1)	0,56
Rezistentan	22 (57,9)	47 (52,2)	69 (53,9)	
Osjetljivost na meropenem				
Osjetljiv	15 (39,5)	25 (27,8)	40 (31,3)	0,19
Rezistentan	23 (60,5)	65 (72,2)	88 (68,8)	
Osjetljivost na kolistin				
Osjetljiv	15 (39,5)	56 (62,2)	71 (55,5)	0,02
Rezistentan	23 (60,5)	34 (37,8)	57 (44,5)	
Osjetljivost na fosfomicin				
Osjetljiv	33 (89,2)	72 (80,0)	105 (82,7)	0,21
Rezistentan	4 (10,8)	18 (20,0)	22 (17,3)	
Osjetljivost na tigeciklin				
Osjetljiv	5 (14,3)	39 (43,3)	44 (35,2)	0,002
Rezistentan	30 (85,7)	51 (56,7)	81 (64,8)	
Osjetljivost na amikacin				
Osjetljiv	31 (81,6)	70 (77,8)	101 (78,9)	0,63
Rezistentan	7 (18,4)	20 (22,2)	27 (21,1)	
Osjetljivost na ceftazidim-avibaktam				
Osjetljiv	33 (94,3)	85 (94,4)	118 (94,4)	> 0,99 [†]
Rezistentan	2 (5,7)	5 (5,6)	7 (5,6)	
Osjetljivost na imipenem-relebaktam				
Osjetljiv	-	44 (48,9)	44 (48,9)	-
Rezistentan	-	46 (51,1)	46 (51,1)	
Osjetljivost na cefiderokol				
Osjetljiv	-	72 (96,0)	72 (96,0)	-
Rezistentan	-	3 (4,0)	3 (4,0)	

* χ^2 test, [†]Fisherov egzaktni test

4.4.1. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentne *K. pneumoniae*

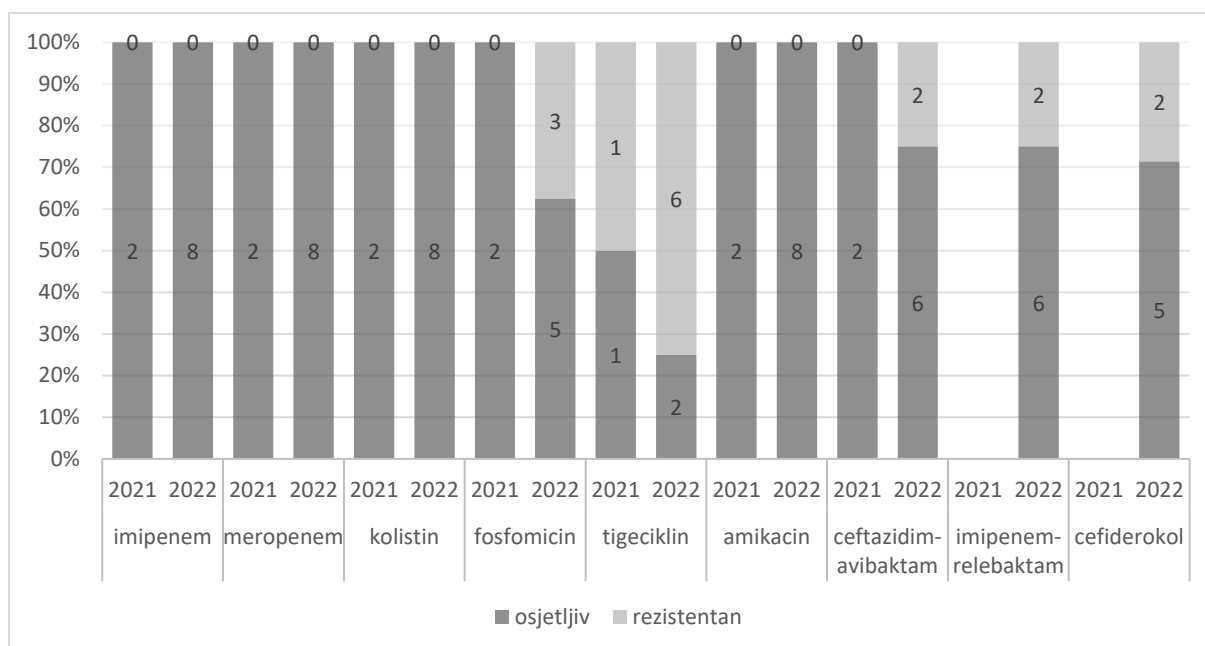
Kod osjetljivosti karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* po godinama uočava se da je tijekom 2021. godine najveća rezistencija na tigecklin, a u 2022. na meropenem. U obje promatrane godine najveći je udio izolata osjetljivih na ceftazidim-avibaktam (Slika 1).



Slika 1. Osjetljivost karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* u odnosu na promatrane godine

4.4.2. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnog *E. cloacae*

Kod osjetljivosti karbapenem rezistentnog *E. cloacae* po godinama uočava se da se u 2021. godini rezistencija javlja samo na tigecklin. Tijekom 2022. godine najviše je izolata rezistentnih na tigecklin, a na imipenem, meropenem, kolistin i amikacin osjetljivi su bili svi izolati (Slika 2).



Slika 2. Osjetljivost karbapenem rezistentnog *E. cloacae* u odnosu na promatrane godine

4.4.3. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentnih *P. stuartii*, *S. marcescens*, *E. coli* i *K. oxytoca*

Oba izolirana soja karbapenem rezistentne *P. stuartii* iz 2021. godine bila su osjetljiva na meropenem i rezistentna na imipenem, kolistin i amikacin. Na fosfomicin i ceftazidim-avibaktam osjetljiv je bio po jedan soj. Jedan soj karbapenem rezistentne *P. stuartii* iz 2022. bio je osjetljiv na ceftazidim-avibaktam, a drugi na amikacin. Oba soja bila su osjetljiva na cefiderokol, a na sve ostale ispitivane antibiotike rezistentna.

Izolirani soj karbapenem rezistentne *S. marcescens* iz 2021. godine bio je osjetljiv samo na amikacin i ceftazidim-avibaktam, a izolirani soj iz 2022. i na meropenem, fosfomicin te imipenem-relebaktam.

Jedini izolirani soj karbapenem rezistentne *E. coli* bio je osjetljiv na sve ispitivane antibiotike, a jedini izolirani soj karbapenem rezistentne *K. oxytoca* bio je rezistentan na sve antibiotike osim kolistina, fosfomicina i cefiderokola.

5. RASPRAVA

5.1. Bakterijski izolati

Iako je pojava prvog izolata enterobakterije koja proizvodi karbapenemazu na području Osječko-baranjske županije zabilježena 2013. godine, isti nije pokazivao rezistenciju na karbapeneme (57). Kako je rečeno u nastavku rasprave, rezistencija na karbapeneme na ovom području tada je bila rijetkost, a rezultati ovog istraživanja, koji pokazuju kako je u posljednje dvije godine broj izoliranih karbapenem rezistentnih enterobakterija samo u bolničkom centru troznamenasti, pokazatelj su njezinog naglog širenja. Pored toga, rezultati ovog istraživanja, koji pokazuju da se rezistencija na karbapeneme u uzorcima pacijenata hospitaliziranih u Kliničkom bolničkom centru Osijek javlja unutar šest vrsta reda *Enterobacterales*, u skladu su s podacima o enterobakterijama kod kojih se na globalnoj razini često detektira rezistencija na karbapeneme (16, 58). Isto tako, najbrojnije karbapenem rezistentne enterobakterije izolati su karbapenem rezistentne *K. pneumoniae*, što se također podudara s mnogim rezultatima istraživanja i praćenja rezistencije na karbapeneme u enterobakterija (58). Razlog tomu nije samo proširenost rezistencije u klepsijela, nego i to da su upravo one te koje se češće od ostalih vrsta izoliraju iz dijagnostičkih uzoraka ili nadzornih briseva. Iznimka su ovdje svakako izolati *E. coli*, koji se iz uzoraka izoliraju češće od ostalih enterobakterija, a podatak da je u ovom istraživanju izoliran samo jedan soj karbapenem rezistentne *E. coli* stoga se može interpretirati kao slaba raširenost rezistencije na karbapeneme u sojeva *E. coli* općenito (18). S obzirom na to da se radi o za čovjeka najznačajnijoj vrsti enterobakterije, takav podatak, usto što je ohrabrujući, predstavlja i mogućnost za ranu intervenciju kako ne bi došlo do daljnjeg širenja rezistencije na karbapeneme u ovog klinički značajnog patogena. Nadalje, nedostatak ovog istraživanja izostanak je podataka o ukupnom broju izoliranih sojeva ovih šest vrsta jer bez njega nije moguće za pojedinu vrstu odrediti udio izolata rezistentnih na karbapeneme. Međutim, s obzirom na to da su podaci o izoliranim bakterijama u Kliničkom bolničkom centru Osijek uključeni u podatke o praćenju rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini, ovdje bi bilo važno istaknuti kako je 2021. u Hrvatskoj zabilježeno 1130 izolata karbapenem rezistentne *K. pneumoniae*. Kao što je rečeno u uvodu, podaci o izolatima prikupljaju se iz 39 centara u Hrvatskoj, što znači da je iste godine prosječan broj izolata karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* iz jednog centra bio 29, što je neznatno manje u usporedbi s 33 izolirana soja karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* u Kliničkom bolničkom centru u Osijeku 2021.

godine (48). Iz svega navedenoga proizlazi da rezistencija enterobakterija na karbapeneme u ovom dijelu Hrvatske dobro korelira s rezistencijom enterobakterija na karbapeneme na nacionalnoj razini. Kako je rečeno i u dijelu o mehanizmima rezistencije, ESBL sojevi visoko su zastupljeni među karbapenem rezistentnim izolatima. Iako ispitivanje učestalosti ESBL sojeva nije bio cilj istraživanja, identifikacija svakog izolata rutinski uključuje i podatak o tome radi li se o soju koji proizvodi ESBL, odnosno β -laktamaze koje hidroliziraju cefalosporine treće generacije, o čemu je bilo riječi u uvodu. Isto tako, rečeno je i kako je širenje istih posljednjih trideset godina potaknulo primjenu karbapenema (16, 17). Po svemu sudeći, primjenom karbapenema nije se uspjelo zaustaviti širenje ESBL enzima, a u ovom se istraživanju porast ESBL sojeva unutar izolata karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* s 36 % u 2021. na gotovo 90 % izolata u 2022. godini pokazao i statistički značajnim. Također, iako nema statističke značajnosti, pojava ESBL se, za razliku od 2021. u kojoj nije bilo ESBL sojeva karbapenem rezistentnih *E. cloacae* i *P. stuartii*, 2022. godine uočava u većine izolata ovih vrsta. Ceftazidim, cefalosporin treće generacije čija se učinkovitost ispitivala u testiranju antimikrobne osjetljivosti izolata, redovito se kombinira s avibaktamom, pa se stoga pokazao učinkovitim na veliku većinu izolata. S obzirom na visoku zastupljenost ESBL sojeva među ispitivanim izolatima, njegova učinkovitost samog zasigurno bi bila mnogo manja.

5.2. Uzorci

Karbapenem rezistentne enterobakterije izolirane su iz dijagnostičkih uzoraka i nadzornih briseva. Na osnovu njihovog opisu u uvodu može se zaključiti kako su općenito najčešće uzročnici uroinfekcija, pneumonije i seapse. S obzirom na to da su u ovom istraživanju sojevi karbapenem rezistentnih enterobakterija najčešće izolirani iz uzoraka urina, krvi i aspirata traheje, može se zaključiti da rezultati istraživanja dobro koreliraju s općim karakteristikama patogenosti vrsta enterobakterija među kojima se često detektira rezistencija na karbapeneme (18). Također, iako u manjem broju, iste su izolirane i iz uzoraka rane, ascitesa i likvora, što pokazuje širinu spektra infekcija gdje se identificiraju kao uzročnici. Nadalje, karbapenem rezistentne enterobakterije izolirane su iz ukupno 17 nadzornih briseva. Svrha uzimanja nadzornih briseva, odnosno analize nadzornih kultura, otkrivanje je kolonizacije pacijenata potencijalno patogenim mikroorganizmom. U tercijarnim se bolničkim centrima najčešće uzimaju brisevi nosa, ždrijela, pazuha, perineuma, rektuma, prepone te oštećenja kože i kirurškog reza (60). Ovo istraživanje pokazalo je kako su u gotovo svim navedenim vrstama nadzornih briseva pronađeni sojevi karbapenem rezistentnih

enterobakterija, što upućuje na to da su karbapenem rezistentne enterobakterije zastupljene i među hospitaliziranim pacijentima kod kojih infekcija nije nužno prisutna. Takav pokazatelj, osim što predstavlja rezultat praćenja stupnja čistoće i higijene pacijenata, upućuje i na dodatni oprez u postupanju s koloniziranim pacijentima. Naime, suzbijanje rezistencije na karbapeneme se, zbog ograničenosti u antimikrobnoj terapiji, mora temeljiti i na prevenciji njezinog širenja. Stoga je potrebno da zdravstvene ustanove za slučajeve detekcije karbapenem rezistentnih enterobakterija poduzmu dodatne mjere u informiranju i obučavanju djelatnika i pacijenata, a koje su u skladu s istraživanjima i praćenjem epidemiološke slike kako na globalnoj, tako i na lokalnoj razini, čiji pregled predstavlja ovo istraživanje (61).

5.3. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme

U preko 90 % izolata dokazana je karbapenemaza, stoga se za proizvodnju karbapenemaza može reći da je glavni mehanizam rezistencije na karbapeneme u ispitivanih enterobakterija. S obzirom na to da ostali mehanizmi rezistencije nisu ispitivani, nije moguće donijeti zaključak o njezinoj udruženosti s hiperprodukcijom efluks pumpi ili gubitkom porina vanjske membrane, ali se, zbog heterogenosti antimikrobne osjetljivosti izolata, svakako može zaključiti da su među njima prisutne razlike u ekspresiji navedenih mehanizama. Nadalje, u preko 80 % izolata bila je dokazana OXA-48 karbapenemaza, iz čega proizlazi da je riječ o trenutno najdominantnijoj karbapenemazi u najvećem bolničkom centru na istoku Hrvatske. Taj podatak ne odstupa od istraživanja iz 2018. godine koje je pokazalo da je na području cijele Hrvatske upravo OXA-48 najučestalije detektirana karbapenemaza (50). Uspoređujući to istraživanje s onim iz 2014. može se zaključiti da je u međuvremenu došlo do njezine predominacije u odnosu na VIM karbapenemazu, koja je u ovom istraživanju detektirana u samo jednog izolata (49). Što se tiče područja Osječko-baranjske županije, prvi slučaj enterobakterije koja proizvodi karbapenemazu zabilježen je 2013. godine. Radilo se o izolatu *E. cloacae* kod kojeg je detektirana VIM karbapenemaza, a koji unatoč tome nije bio rezistentan na karbapeneme (57). U tom je razdoblju, dakle, rezistencija na karbapeneme bila rijetkost, a prisutnost karbapenemaza dokazivana je molekularnim metodama koje su u ovom istraživanju zamijenjene brzim testovima. Pored OXA-48, među ispitivanim su izolatima, osim IMP karbapenemaze, koja nije široko rasprostranjena niti u Europi, dokazane sve klinički najvažnije karbapenemaze. Iako su malobrojnije, s obzirom na njihov epidemijski potencijal, KPC i NDM karbapenemaze ne treba zanemariti. Međutim, dominacija OXA-48 karbapenemaze potvrda je pretpostavki o opasnosti koju predstavlja. Još prije desetak godina,

skupina mikrobiologa iz Švicarske je, na osnovu njezinih karakteristika i ranih istraživanja, upozorila na epidemijski potencijal koji OXA-48 posjeduje (45, 46). Slaba karbapenemazna aktivnost, uzak spektar β -laktama koje hidrolizira te izrazita plazmidna konjugativnost omogućile su joj, ne samo brzo širenje, nego i višegodišnju dominaciju u ovom dijelu Europe. Također, posebno je zanimljivo da su u jednog izolata detektirane i NDM i OXA-48 karbapenemaza, odnosno da 0,8 % enterobakterija proizvodi više od jedne karbapenemaze. Isti taj udio nedavno je pokazalo i istraživanje proizvodnje karbapenemaza u izolata enterobakterija na sjeveru Italije, ali na većem uzorku. Naime, od 1242 analizirana uzorka u deset je dokazana neka od kombinacija KPC, VIM, NDM ili OXA-48 karbapenemaze (63). U nešto manje od 10 % izolata karbapenemaza nije dokazana, pa se može zaključiti kako su ti izolati bili rezistentni na karbapeneme posredstvom mehanizama poput hiperprodukcije efluks pumpi ili gubitka porina vanjske membrane, u mogućoj kombinaciji s proizvodnjom ESBL ili AmpC β -laktamaza. Istraživanje je od navedenih mehanizama obuhvatilo samo ispitivanje proizvodnje ESBL za koje se, zbog visoke zastupljenosti među izolatima, može pretpostaviti da ima značajnu ulogu i da, uz neki od navedenih mehanizama, uvjetuje rezistenciju na karbapeneme u izolata kod kojih proizvodnja karbapenemaze nije dokazana. Istraživanje koje su 2013. godine Goessens i suradnici proveli na izolatu karbapenem rezistentne *E. coli* pokazalo je da je rezistencija bila posredovana kombinacijom proizvodnje ESBL i gubitka porina (38). Ono po čemu se takvo istraživanje razlikuje od ovog je sama metodologija. Naime, za ispitivanje hiperprodukcije efluks pumpi ili gubitka porina nisu dovoljni imunokromatografski testovi kao za dokazivanje karbapenemaza, nego su najčešće potrebne molekularne metode koje u ovom istraživanju nisu korištene.

5.4. Antimikrobna osjetljivost

Interpretacijom rezultata testiranja antimikrobne osjetljivosti izolata karbapenem rezistentnih enterobakterija jasno se može zaključiti da su najdjelotvorniji antibiotici ceftazidim-avibaktam i cefiderokol. S obzirom na to da je ceftazidim-avibaktam u primjeni od 2015., a cefiderokol od 2020. godine, takvi su rezultati očekivani jer rezistencija na njih nije razvijena kao na ostale antibiotike koji su u primjeni mnogo duže (63, 64). Međutim, imipenem-relebaktam, antibiotik u primjeni od 2019. godine, nije se pokazao učinkovitim niti na polovicu izolata. Razlog tomu svakako je nedjelotvornost inhibitorске komponente, odnosno relebaktama koji, za razliku od avibaktama, ne inhibira karbapenemaze grupe D (55). S obzirom na to da preko 80 % ispitivanih izolata proizvodi upravo OXA-48 karbapenemazu,

slaba djelotvornost imipenem-relebaktama nije začuđujuća. Potvrda tomu je i to što je osjetljivost izolata na imipenem-relebaktam tek neznatno veća u odnosu na osjetljivost na imipenem bez relebaktama. Ipak, i djelotvornost imipenema samog i u kombinaciji s relebaktamom veća je od meropenema, drugog ispitivanog karbapenema, koji je s djelovanjem na manje od trećine izolata najneučinkovitiji antibiotik u ovom istraživanju. Promatrajući osjetljivost izolata iz obje godine na stare antibiotike, fosfomicin i amikacin mnogo su djelotvorniji od kolistina i tigeciklina. Da bi se našao razlog za to, uz podatke o učinkovitosti u fazama njihovog razvoja, potrebno bi bilo istražiti njihovu primjenu, kako za druge indikacije, tako i u sklopu liste rezervnih antibiotika u liječenju infekcija rezistentnim patogenima. Pojednostavljeno rečeno, na rezultate testiranja osjetljivosti u ovom istraživanju utjecaj imaju primarni spektar djelovanja antibiotika te širina i učestalost njegove primjene, koje određuju stupanj stečene rezistencije izolata na kojima je ispitivana učinkovitost antibiotika. Iako je, ukupno gledano, osjetljivost izolata na kolistin i tigeciklin na niskoj razini, u 2022. statistički je značajno porasla u odnosu na 2021. godinu. Mogući razlog tomu njihova je slabija primjena tijekom 2021. godine zbog visoke rezistencije koja je tada bila prisutna. Drugim riječima, s obzirom na to da su se tijekom 2021. pokazali učinkovitijima, fosfomicin, amikacin i ceftazidim-avibaktam vjerojatno su primjenjivani češće od kolistina i tigeciklina, što je mogući uzrok ne samo sprječavanja razvoja rezistencije na kolistin i tigeciklin, nego i porasta osjetljivosti izolata na ta dva antibiotika. U prilog ovakvom razmatranju idu i dobiveni rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike koji su u 2021. godini bili visoko učinkoviti. Naime, iako se pad osjetljivosti izolata na fosfomicin i amikacin tijekom 2022. nije pokazao statistički značajnim, iz tabličnih i slikovnih prikaza jasno je da je prisutan. Iako ovim istraživanjem nisu istraženi podaci o učestalosti primjene navedenih antibiotika, odnos između povećane primjene i relativno brzog porasta rezistencije na određeni antibiotik u tercijarnom bolničkom centru poznata je pojava, a među prvima istražili su ju Rahal i suradnici još u radu iz 1998. godine na primjeru imipenema. U analizi antimikrobne osjetljivosti bakterija roda *Klebsiella* u dvogodišnjem razdoblju pokazali su kako je smanjenje primjene ceftazidima za 73 % i povećanje primjene imipenema za 140 % rezultiralo povećanjem osjetljivosti izolata na ceftazidim za 44 % i smanjenjem osjetljivosti izolata na imipenem za 69 % (65). Iz navedenog proizlazi kako je u primjeni antibiotika važno održavati ravnotežu jer rezistencija na antibiotik koji predstavlja zamjenu prethodno primjenjivanog ima veliki trend porasta kroz kratko vremensko razdoblje. Pozitivna strana ovakve pojave, koju je Peterson 2005. nazvao “učinkom balona”, jest da vrijedi i obrnuto – bakterije na antibiotik koji je zamijenjen drugim razvijaju osjetljivost (66). S obzirom na to da

se u preko 85 % izolata čija je osjetljivost ispitivana radilo o sojevima *K. pneumoniae*, osjetljivost karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* u velikoj se mjeri podudara s rezultatima testiranja osjetljivosti svih karbapenem rezistentnih enterobakterija. Što se tiče karbapenem rezistentnog *E. cloacae*, izolati te vrste su, za razliku od izolata *K. pneumoniae*, bili potpuno osjetljivi na imipenem, meropenem, kolistin i amikacin. Također, učinkovitost cefiderokola na *E. cloacae* uvelike se razlikuje od njegove učinkovitosti na ostale vrste jer se iz slikovnog prikaza može iščitati da je osjetljivost ispitivanih sojeva *E. cloacae* tek nešto viša od 70 %. Ponajprije se to odnosi na razliku u odnosu na osjetljivost karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* budući da je ukupan broj izolata ostalih vrsta premalen da bi se kvalitetno ocijenila njihova osjetljivost pojedinačno. Ipak, za karbapenem rezistentnu *P. stuartii* i karbapenem rezistentnu *S. marcescens* može se reći kako je između ispitivanih izolata prisutna heterogenost u osjetljivosti na pojedine antibiotike, dok se za ispitivani izolat karbapenem rezistentne *E. coli* može reći kako je, za razliku od karbapenem rezistentnog izolata *K. oxytoca*, s obzirom na to da je bio osjetljiv na sve ispitivane antibiotike, u velikoj mjeri osjetljivija od ostalih karbapenem rezistentnih vrsta.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Sojevi rezistentni na karbapeneme javljaju se unutar šest vrsta reda *Enterobacterales* – *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *E. coli* i *K. oxytoca*.
2. Najbrojnije karbapenem rezistentne enterobakterije izolati su karbapenem rezistentne *K. pneumoniae*, a udio ESBL sojeva unutar karbapenem rezistentnih izolata *K. pneumoniae* u statistički je značajnom porastu.
3. Karbapenem rezistentne enterobakterije najčešće se izoliraju iz dijagnostičkih uzoraka, odnosno uzoraka urina, uzoraka krvi i aspirata traheje.
4. U 90,6 % ispitivanih izolata dokazana je proizvodnja karbapenemaze, detektirane su OXA-48, KPC, NDM i VIM karbapenemaza.
5. Najzastupljeniji mehanizam rezistencije na karbapeneme u karbapenem rezistentnih enterobakterija proizvodnja je OXA-48 karbapenemaze.
6. Antibiotici s najučinkovitijim djelovanjem na karbapenem rezistentne enterobakterije su cefiderokol i ceftazidim-avibaktam, a antibiotici s najslabijim djelovanjem na karbapenem rezistentne enterobakterije su meropenem i tigeciklin.
7. Osjetljivost karbapenem rezistentnih enterobakterija na kolistin i tigeciklin u statistički je značajnom trendu porasta.
8. Antimikrobna osjetljivost karbapenem rezistentne *K. pneumoniae* se zbog najvećeg udjela među svim izolatima podudara s antimikrobnom osjetljivošću svih karbapenem rezistentnih enterobakterija.
9. Izolati karbapenem rezistentnog *E. cloacae* potpuno su osjetljivi na imipenem, meropenem, kolistin i amikacin, ali je prisutan viši stupanj rezistencije na cefiderokol u odnosu na ostale vrste.
10. Između sojeva karbapenem rezistentnih *P. stuartii* i *S. marcescens* prisutna je heterogenost u osjetljivosti na ispitivane antibiotike, a karbapenem rezistentna *E. coli* osjetljiva je na najširi spektar antibiotika od svih karbapenem rezistentnih enterobakterija.

7. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Ispitati učestalost karbapenem rezistentnih vrsta reda *Enterobacterales* u tercijarnom bolničkom centru, njihovu osjetljivost na antibiotike te učestalost proizvodnje pojedinih vrsta karbapenemaza.

Nacrt studije: presječno istraživanje

Materijali i metode: Analizirani su podaci o uzorcima hospitaliziranih pacijenata u razdoblju od 1. siječnja 2021. do 31. prosinca 2022. godine. U identifikaciji bakterijskih vrsta korišten je MALDI-TOF maseni spektrometar uz MALDI Bruker Biotyper bazu te IVD komercijalizirana platformu za identifikaciju i testiranje osjetljivosti na antibiotike BD Phoenix M50. U testiranju osjetljivosti korištene su i standardizirana disk-difuzijska metoda po Kirby-Baueru te e-test metoda prema EUCAST metodologiji. Detekcija karbapenemaza obavljena je pomoću komercijalnog imunokromatografskog testa RESIST-% O.K.N.V.I. Korištene statističke metode u obradi podataka su χ^2 test i Fisherov egzaktni test.

Rezultati: U dvogodišnjem razdoblju izolirano je 128 sojeva karbapenem rezistentnih enterobakterija, od čega najviše sojeva *K. pneumoniae* (85,9 %). Sojevi su najčešće izolirani iz uzoraka urina (42,2 %). U 81,3 % izolata detektirana je OXA-48 karbapenemaza. Osjetljivost ispitivanih izolata pokazala se najvećom u slučaju cefiderokola (96 %) i ceftazidim-avibaktama (94,4 %), a najmanjom u slučaju meropenema (31,3 %) i tigeciklina (35,2 %). Statistički značajnim pokazao se porast osjetljivosti karbapenem rezistentnih enterobakterija na kolistin i tigeciklin tijekom 2022. u odnosu na 2021. godinu.

Zaključak: Izolirano je 128 sojeva karbapenem rezistentnih enterobakterija, a najveći je udio sojeva *K. pneumoniae*. Najzastupljeniji mehanizam rezistencije na karbapeneme proizvodnja je OXA-48 karbapenemaze. Najviše izolata bilo je osjetljivo na ceftazidim-avibaktam i cefiderokol, a najmanje na meropenem i tigeciklin.

Ključne riječi: antimikrobna osjetljivost, *Enterobacterales*, karbapenemaza, rezistencija na karbapeneme

8. SUMMARY

Antimicrobial sensitivity of carbapenem-resistant *Enterobacterales*

Objectives: To examine the frequency of carbapenem-resistant species of the order *Enterobacterales* in a tertiary hospital centre, their sensitivity to antibiotics and the frequency of production of certain types of carbapenemases.

Study design: cross-sectional study

Materials and methods: Data on samples of hospitalized patients in the period from January 1, 2021 to December 31, 2022 were analysed. In the identification of bacterial species, a MALDI-TOF mass spectrometer was used with the MALDI Bruker Biotyper base and IVD commercialized platform for identification and sensitivity testing to antibiotics BD Phoenix M50. In sensitivity testing, the standardized disk-diffusion method according to Kirby-Bauer and the e-test method according to the EUCAST methodology were used. Detection of carbapenemases was performed using the commercial immunochromatographic test RESIST-% O.K.N.V.I. Statistical methods used in data processing are χ^2 test and Fisher's exact test.

Results: In a two-year period, 128 strains of carbapenem-resistant enterobacteria were isolated, most of which were strains of *K. pneumoniae* (85.9%). The strains were most often isolated from urine samples (42.2%). OXA-48 carbapenemase was detected in 81.3% of isolates. The sensitivity of the tested isolates was the highest in the case of cefiderocol (96%) and ceftazidime-avibactam (94.4%), and the lowest in the case of meropenem (31.3%) and tigecycline (35.2%). The increase in the sensitivity of carbapenem-resistant enterobacteria to colistin and tigecycline during 2022 compared to 2021 proved to be statistically significant.

Conclusion: 128 strains of carbapenem-resistant enterobacteria were isolated, the largest share being *K. pneumoniae* strains. The most prevalent mechanism of resistance to carbapenems is the production of OXA-48 carbapenemase. The most isolates were sensitive to ceftazidime-avibactam and cefiderocol, and the least to meropenem and tigecycline.

Key words: antimicrobial sensitivity, carbapenemase, carbapenem-resistant, *Enterobacterales*

9. LITERATURA

1. Lutgring JD. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An emerging bacterial threat. *Semin Diagn Pathol.* 2019;36(3):182-186.
2. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Datum pristupa: 24.04.2023.
3. Jukić M, Gašparović V, Husedžinović I, Majerić Kogler V, Perić M, Žunić J. *Intenzivna medicina.* Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
4. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):18.
5. Lodise TP, Berger A, Altincatal A, Wang R, Bhagnani T, Gillard P, i sur. Antimicrobial Resistance or Delayed Appropriate Therapy-Does One Influence Outcomes More Than the Other Among Patients With Serious Infections Due to Carbapenem-Resistant Versus Carbapenem-Susceptible Enterobacteriaceae? *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(6):ofz194.
6. Bassetti M, Carnelutti A, Peghin M. Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in gram-negative bacterial infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(1):55-65.
7. Tumbarello M, Treccarichi EM, Tumietto F, Del Bono V, De Rosa FG, Bassetti M, i sur. Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(6):3514-20.
8. Righi E, Peri AM, Harris PN, Wailan AM, Liborio M, Lane SW, i sur. Global prevalence of carbapenem resistance in neutropenic patients and association with mortality and carbapenem use: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(3):668-677.
9. World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Datum pristupa: 24.04.2023.

10. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(5):518-24.
11. Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy.* 2008;28(2):235-49.
12. Jelić M. Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enetrobakterija otpornih na karbapeneme [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2018
Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:737644> Datum pristupa: 27.04.2023.
13. Kumar VA, Khan S. Defining multidrug resistance in Gram-negative bacilli. *Indian J Med Res.* 2015;141(4):491.
14. Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy.* 2012;32(5):399-407.
15. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-86.
16. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med.* 2017;37(2):303-315.
17. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;27(2):128-42.
18. Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
19. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):4943-60.
20. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-195.
21. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(1):23-37.
22. Haidar G, Clancy CJ, Chen L, Samanta P, Shields RK, Kreiswirth BN i sur. Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime-Avibactam and Imipenem-

- Relebactam against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e00642-17.
23. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y i sur. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472-3500.
24. Narayanan N, Johnson L, MacDougall C. Beyond Susceptible and Resistant, Part III: Treatment of Infections due to Gram-Negative Organisms Producing Carbapenemases. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016;21(2):110-9.
25. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J; European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(46):19716.
26. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
27. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58, table of contents.
28. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Suppl 4:4-9.
29. Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep.* 2018;20(6):13.
30. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel).* 2018;6(1):1.
31. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):306-25.
32. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076-18.
33. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):821-30.

34. Stewart A, Harris P, Henderson A, Paterson D. Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(11):e01195-18.
35. Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJV. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol.* 2018;169(7-8):425-431.
36. Bialek-Davenet S, Mayer N, Vergalli J, Duprilot M, Brisse S, Pagès JM i sur. In-vivo loss of carbapenem resistance by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment via porin expression modification. *Sci Rep.* 2017;7(1):6722.
37. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):565-9.
38. Goessens WH, van der Bij AK, van Boxtel R, Pitout JD, van Ulsen P, Melles DC i sur. Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2 β -lactamase combined with reduced outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(8):3941-9.
39. Centers for Disease Control and Prevention. CRE Technical Information. Dostupno na adresi: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#Definition>. Datum pristupa: 16.05.2023.
40. Salisbury WA, Likos JJ. Hydrolysis of casein: a differential aid for the identification of *Serratia marcescens*. *J Clin Pathol.* 1972;25(12):1083-5.
41. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):824-9.
42. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases.* 2011;17(10):1791-1798.
43. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R i sur. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-90.

44. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-91.
45. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-606.
46. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31):20549.
47. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K i sur. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-54.
48. Tambić Andrašević A, Tambić T, ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021.g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2021.
49. Zujčić Atalić V, Bedenić B, Kocsis E, Mazzariol A, Sardelić S, Barišić M i sur. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia--the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(11):O894-903.
50. Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A i sur. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol.* 2018;67(8):1031-1041.
51. European medicines agency. Vaborem. Dostupno na adresi: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaborem>. Datum pristupa: 17.05.2023.
52. Santini M, Kotarski V. Liječenje sepse i pneumonije prouzročenih multirezistentnim gram-negativnim bakterijama. *Medicus.* 2016;25(1):57-63.
53. Almangour TA, Alenazi B, Ghonem L, Alhifany AA, Aldakheel BA, Alruwaili A. Inhaled colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria: A real-life experience in tertiary care hospitals in Saudi Arabia. *Saudi Pharm J.* 2020;28(8):1009-1013.

54. Katzung BG. Temeljna i klinička farmakologija. 14. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2020.
55. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):122.
56. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 6. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
57. Bedenić B, Zujčić Atalić V, Bogdan M, Beader N, Godić Torkar K, Ižaković S. First report of carbapenemases in Osijek-Baranja County in imported *Enterobacter Cloacae* isolate in vitro susceptible to carbapenems. *Liječnički vjesnik*. 2015;137(1-2).
58. Davari N, Khashei R, Pourabbas B, Nikbin VS, Zand F. High frequency of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* fecal carriage among ICU hospitalized patients from Southern Iran. *Iran J Basic Med Sci*. 2022;25(12):1416-1423.
59. Madunović I. Nadzorni obrisci u Zavodu za intenzivnu medicinu u jednogodišnjem razdoblju [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2019. Dostupno na adresi: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:511408> Datum pristupa: 30.5.2023.
60. Centers for Disease Control and Prevention. Clinicians: Information about CRE. Dostupno na adresi: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-clinicians.html>. Datum pristupa: 30.05.2023.
61. Bianco G, Boattini M, Comini S, Casale R, Iannaccone M, Cavallo R i sur. Occurrence of multi-carbapenemases producers among carbapenemase-producing *Enterobacterales* and in vitro activity of combinations including cefiderocol, ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and aztreonam in the COVID-19 era. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022;41(4):573-580.
62. U. S. Food and Drug Administration. Drug Approval Package. Dostupno na adresi: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206494orig1s000toc.cfm. Datum pristupa: 01.06.2023.

63. European medicines agency. Fetroja. Dostupno na adresi:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fetroja>. Datum pristupa:
01.06.2023.
64. Rahal JJ, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J i sur. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*. 1998;280(14):1233-7.
65. Peterson LR. Squeezing the antibiotic balloon: the impact of antimicrobial classes on emerging resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11 Suppl 5:4-16.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Stipe Madunović

Medicinski fakultet Osijek

email: stipe.madunovic@gmail.com

Mjesto i datum rođenja: Osijek, 11. veljače 1999.

Adresa stanovanja: Bračka 138b, 31000 Osijek

Obrazovanje:

Od 2017. Sveučilišni integrirani prijediplomski i diplomski studij Medicina
Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Od 2013. do 2017. III. gimnazija Osijek