

# Metode detekcije enterobakterija rezistentnih na karpabeneme

---

Glavaš, Sara

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:152:427564>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Sara Glavaš**

**METODE DETEKCIJE**

**ENTEROBAKTERIJA REZISTENTNIH**

**NA KARBAPENEME**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Sara Glavaš**

**METODE DETEKCIJE  
ENTEROBAKTERIJA REZISTENTNIH  
NA KARBAPENEME**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023**

Rad je ostvaren u : Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju, Klinički bolnički centar Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Maja Bogdan

Rad ima 47 listova, 21 tablica, 23 slika

## Zahvala

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Bogdan na usmjeravanju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Također, zahvale za pomoć, podršku i strpljenje upućujem svojoj obitelji i prijateljima.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Enterobacterales.....	1
1.2. Uzorkovanje, uzgoj i identifikacija enterobakterija .....	2
1.3. Osjetljivost enterobakterija na antibiotike .....	3
1.3.1. Mehanizmi rezistencije .....	4
1.4. Karbapenemaze .....	5
1.5. Metode detekcije.....	7
1.5.1. Fenotipski testovi .....	7
1.5.2. Genotipski testovi .....	10
2. CILJ RADA.....	11
3. MATERIJALI I METODE RADA .....	12
3.1. Ustroj studije.....	12
3.2. Etička načela.....	12
3.3. Kulture enterobakterija i testiranje rezistencije na karbapeneme .....	12
3.4. Metode .....	13
3.4.1. Metoda kombiniranih diskova .....	13
3.4.2. Lateral flow test .....	14
3.4.3. Carba NP test .....	16
3.4.4. Modificirani Hodgeov test .....	17
3.4.5. Metoda inaktivacije karbapenema (CIM) .....	18
3.4.6. Genotipski test .....	19
3.5. Statističke metode.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Učestalost enterobakterija u periodu od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023. ....	21
4.2. Broj i udio enterobakterija rezistentnih na karbapeneme .....	25
4.3. Broj i udio karbapenem rezistentnih enterobakterija(KRE) i osjetljivih enterobakterija .....	28
4.4. Prisutnost karbapenemaza .....	28
4.5. Distribucija enzima po vrstama enterobakterija po godinama .....	32
4.6. Trend Klebiselle po godinama.....	36
5. RASPRAVA.....	37
6. ZAKLJUČAK .....	40
7. SAŽETAK.....	41

8. SUMMARY .....	42
9. LITERATURA:.....	43
10. ŽIVOTOPIS .....	47

## POPIS KRATICA

AmpC – klasa C  $\beta$  - laktamaza

CIM – *engl. The carbapenem inactivation method*

EDTA – *engl. Ethylenediaminetetraacetic acid*

ESBL – *engl. extended spectrum  $\beta$ -lactamase*

IMP – imipenemaza

KPC - *engl. Klebisella pneumoniae carbapenemase*

KRE – karbapenem rezistentne enterobakterije

MALDI - TOF – *engl. matrix - assisted laser desorption ionization time-of- flight*

MRP – meropenem

MRPBO - meropenem + fenilborična kiselina

MRPCX - meropenem + kloksacilin

MRPDP - meropenem + dipikolinska kiselina i temocilin 30  $\mu$ g

NDM - *engl. New Delhi metallo-beta-lactamase*

OXA - 48 - oksacilinaza, enzim

VIM – *engl. Verona integron-encoded metallo –  $\beta$  – lactamase*



## 1. UVOD

### 1.1. Enterobacterales

*Enterobacterales* porodica je gram-negativnih štapića koje kod ljudi pronalazimo u probavnom sustavu, a zajedno sa stafilokokima i streptokokima jedni su od najčešćih uzročnika bakterijskih infekcija. Neki od rodova unutar ove porodice su *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* i *Proteus* (1). Enterobakterije dijele se na primarno patogene i oportunističke. Najčešće primarno patogene enterobakterije koje se uglavnom prenose fekalno - oralnim putem su *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* te neki patotipovi *Escherichia coli* i podvrste u rodu *Klebsiella*. U enterobakterije koje uzrokuju oportunističke infekcije ubrajamo komenzalne tipove *E. coli* te određene vrste u rodovima *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* i *Citrobacter* (2). *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* te *Enterobacter spp.* među najčešćim su uzročnicima infekcija mokraćnog sustava, a *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* te enteropatogena, enterotoksična, enteroinvazivna i enterohemoragična *E. coli* među najčešćim su uzročnicima infekcija probavnog sustava (3). Enterobakterije fakultativni su anaerobi koji imaju veliku sposobnost prilagodbe na prisutnost i odsutnost kisika. Sve enterobakterije su gram negativni asporogeni štapići. Većina enterobakterija je pokretna, dok samo neke vrste posjeduju kapsulu. Nadalje, neke vrste posjeduju fimbrije koje im omogućuju veći afinitet za stanicu na koju adheriraju (4). Sve enterobakterije imaju enzim za fermentaciju glukoze te su katalaza pozitivne, a oksidaza negativne. Genom enterobakterija sadržava gene na kromosomu i gene na plazmidima koji se mogu rekombinirati i utjecati na fenotip te se tako odraziti na otpornost na antibiotike i virulenciju (4).

Antigenska struktura enterobakterija vrlo je složena te se one razvrstavaju u više od 150 različitih toplinski stabilnih somatskih O (lipopolisaharidni) antigena, više od 100 toplinski labilnih K (kapsularnih) antigena i više od 50 H (flagelarnih) antigena (1). O antigen dio je stanične stijenke enterobakterija koji je otporan na toplinu i alkohol te obično se detektira aglutinacijom. Antitijela na O antigene većinom su IgM klase. Svaki rod *Enterobacterales* povezan je sa specifičnim O skupinama, ali jedan organizam može nositi nekoliko O antigena (1). Kapsularni antigeni, koji su po građi polisaharidi ili proteini, prekrivaju O antigene. Zbog prekrivanja O antigena, K antigeni mogu interferirati aglutinaciju pomoću O antiseruma i mogu biti povezani s virulencijom (1). K antigen ne posjeduju sve enterobakterije u jednakim količinama.

Bakterijske kolonije koje posjeduju K antigen sluzavog su izgleda (4). H antigeni nalaze se na flagelama i lako se denaturiraju toplinom ili alkoholom. H antigen građen je od flagelarnog proteina u kojem redosljed aminokiselina određuje antigensku specifičnost. H antigeni aglutiniraju s anti-H antitijelima, uglavnom IgG klase (1).

## 1.2. Uzorkovanje, uzgoj i identifikacija enterobakterija

Enterobakterije na osnovnim hranjivim podlogama poput krvnog agara, čokoladnog agara, kromogenog agar, srčano-moždanog bujona stvaraju velike, sive, glatke i sjajne kolonije koje imaju pravilni rub, a iznimka je rod *Proteus* kod kojega se rubovi kolonije koncentrično šire. Zbog brže identifikacije, za uzgoj enterobakterija također se koriste i diferencijalne i selektivne podloge poput Salmonella-Shigella agara (SS), ksiloza-lizin dehidrogenaza agara (XLD) i MacConkey agara (4). SS agar koristi se za identifikaciju *Salmonella spp.* i *Shigella spp.*, a temelji se na upotrebi žučnih soli, brilliant green boje koji inhibiraju rast gram pozitivnih bakterija te na fermentaciji laktoze i proizvodnji sumporovodika (H<sub>2</sub>S) za diferencijaciju (5). XLD agar temeljen je na fermentaciji laktoze, ksiloze i saharoze, dekarboksilaciji lizina te proizvodnji sumporovodika. Primarno se koristi za diferencijaciju *Salmonella spp.* i *Shigella spp.*, ali i za uzgoj *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter koseri* i *Yersinia enterocolitica* (6). MacConkey agar selektivna je i diferencijalna podloga kod koje kristal violet boja i žučne soli zaustavljaju rast gram pozitivnih bakterija, a enterobakterije uzgojene na ovom agaru razlikujemo po njihovoj sposobnosti fermentacije laktoze. Tako na primjer *E. coli* i *Klebsiella* koje fermentiraju laktozu snižavaju pH medija te stvaraju crvene kolonije, dok *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia* ne fermentiraju laktozu pa su njihove kolonije na ovom agaru bezbojne (7).

*E. coli* najčešće uzrokuje bolesti probavnog i mokraćnog sustava pa se kao uzorci koji se uzimaju su mokraćna, stolica i bris rektuma, a s obzirom da *E. coli* također može uzrokovati sepsu i infekcije rana pa se u tom slučaju uzorkuju krv te brisevi rana. U rodu *Klebsiella* najčešći uzročnik infekcija je *K. pneumoniae* koja uzrokuje nekrotizirajuću pneumoniju, infekcije mokraćnog sustava, postoperativne infekcije i sepsu pa su neki od uzoraka za dokazivanje *Klebsiella* urin, aspirat bronha, uzorak krvi te bris rane. Rod *Salmonella* uzrokuju bolesti probavnog sustava pa su uzorci za dijagnostiku salmoneloza stolica, sumnjiva hrana i krv za hemokulturu. Uzorci za dijagnostiku roda *Shigella* su stolica ili obrisak rektuma s obzirom da ovaj rod uzrokuje infekcije probavnog sustava.

Vrste iz roda *Proteus* većinom su uzročnici infekcija mokraćnog sustava pa se kao uzorak za laboratorijsku dijagnostiku uzima urin. Rod *Enterobacter* uzrokuje infekcije mokraćnog sustava i sepsu, a vrste koje najčešće uzrokuju infekcije su *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter aerogenes*. Ovisno o infekciji kao uzorci se koriste urin i krv. *S. marcescens* uzrokuje bolničke infekcije, najčešće urinarne pa se kao uzorak koristi uzorak urina. Osim urinarnih infekcija, *S. marcescens* može uzrokovati infekcije rana i bakterijemiju (2).

Biokemijska identifikacija enterobakterija temelji se na razgradnji ugljikohidrata i aminokiselina (2). Sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća uvedena je brza metoda za identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama odnosno biokemijsko ispitivanje enterobakterija mikrometodom pa tako na primjer postoji komercijalni test naziva API20E (8). Ovaj test sadrži 20 jažica minijaturiziranih, dehidriranih, konvencionalnih biokemijskih testova kao što su na primjer citratni test, Voges-Proskauerova reakcija, galaktozidaza, koji su inokulirani mikrobnom suspenzijom. Nakon inkubacije podaci se očitavaju ručno ili automatski (8). U novije vrijeme, koristi se pouzdanija i brža metoda identifikacije MALDI-TOF (*engl. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) masena spektrometrija. Uzgojene enterobakterije identificiraju se u masenom spektrometru spektrom mase proteina. Maseni spektar imobiliziranih, intaktnih bakterija određuje se pod definiranim uvjetima te u usporedbi s bazom podataka spektara poznatih bakterija (8). Ova tehnologija omogućuje stvaranje karakterističnih masenih spektralnih biomarkera koji su jedinstveni za svaki mikroorganizam te je zbog toga ova tehnologija idealna za identifikaciju na razini roda i vrste (9).

### 1.3. Osjetljivost enterobakterija na antibiotike

Većina enterobakterija osjetljiva je na karbapeneme, aminoglikozide, kinolone i kloramfenikol, a različita im je otpornost na cefalosporine, tetracikline i aminopeniciline. Također, sve vrste enterobakterija rezistentne su na penicilin G zbog građe stanične stijenke (4). Međutim, u posljednje vrijeme vrlo se često detektiraju enterobakterije koje proizvode karbapenemaze,  $\beta$ -laktamaze koje hidroliziraju peniciline, u većini slučajeva cefalosporine, karbapeneme poput imipenema, meropenema, ertapenema i doripenema te monobaktame. Navedeni antibiotici svrstavaju se u skupinu  $\beta$ -laktama koji u svojoj strukturi sadrže  $\beta$ -laktamski prsten (10). Posljednično dolazi do otpornosti enterobakterija na navedene antibiotike što predstavlja veliki problem u zdravstvu jer su karbapenemi sve češće potrebni za liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (*engl. extended spectrum  $\beta$ -lactamase*; ESBL) (11).

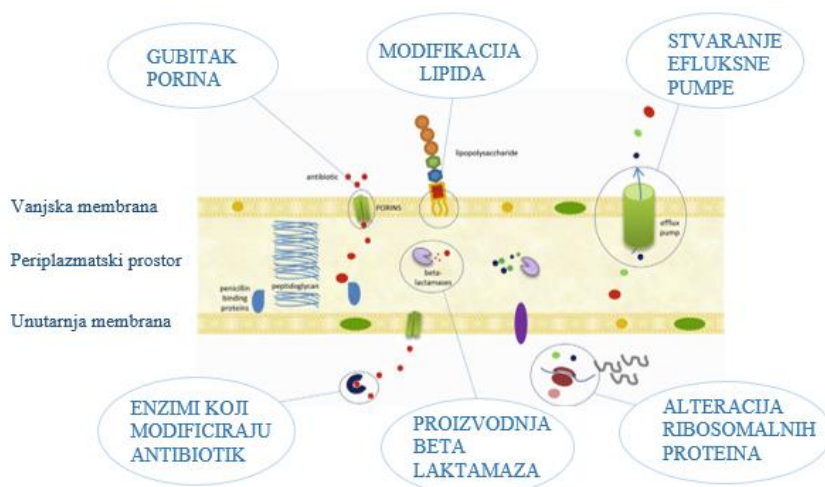
Rezistencija na karbapeneme odnosi se na sposobnost enterobakterija da prežive i rastu u prisutnosti klinički relevantnih koncentracija karbapenema. Američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti definira enterobakterije otporne na karbapeneme kao enterobakterije koje nisu osjetljive ni na jedan karbapenem odnosno pokazuju minimalnu inhibitornu koncentraciju od 4 mg/L za doripenem, meropenem, imipenem ili 2 mg/L za ertapenem ili dokumentirano proizvode karbapenemazu dok je prema EUCAST metodologiji minimalna inhibitorna koncentracija za meropenem  $\leq 2$  mg/L, a za ertapenem  $\leq 0,5$  mg/L (12,13). Prema EUCAST-u neke od najčešće izoliranih i klinički važnih karbapenem rezistentnih enterobakterija su *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Citrobacter spp.* i *Providencia spp.* (13).

### 1.3.1. Mehanizmi rezistencije

Postoji nekoliko mehanizama rezistencije enterobakterija na karbapeneme. Prvi mehanizam je proizvodnja karbapenemaza odnosno enzima koji inaktiviraju karbapeneme hidrolizom, a pronalazimo ih u periplazmatskom prostoru (12). Većina karbapenemaza stečeni su enzimi kodirani genima na plazmidima. Karbapenemaze razlikuju se u biokemijskim karakteristikama i djelovanju protiv specifičnih  $\beta$ -laktama. Razina ekspresije gena i svojstva  $\beta$ -laktamaze te povezanost s drugim mehanizmima rezistencije rezultiraju širokim rasponom fenotipova koji su uočeni među izolatima koji proizvode karbapenemazu (13). Nadalje, drugi mehanizam rezistencije je stvaranje efluksne pumpe koja izbacuje karbapeneme iz bakterijske stanice. Još jedan od mehanizama rezistencije je mutacija ili gubitak porina što onemogućuje ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu (12). Međutim, pojedini izolati koji posjeduju gen za karbapenemazu mogu se kategorizirati kao osjetljivi na karbapeneme dok s druge strane odsutnost gena karbapenemaze ne znači da je bakterija osjetljiva na karbapeneme s obzirom da postoje mehanizmi rezistencije koji ne uključuju proizvodnju karbapenemaza već promjene u propusnosti vanjske membrane (12).

Smanjena osjetljivost na karbapeneme kod enterobakterija također može biti uzrokovana  $\beta$ -laktamazama proširenog spektra (ESBL) ili enzimima AmpC u kombinaciji sa smanjenom propusnošću zbog promjene ili smanjene regulacije porina ili zbog moguće promjene proteina koji vežu penicilin. Kao i druge karbapenemaze, ESBL su stečeni enzimi kodirani genima na plazmidima enterobakterija. Ovisno o razini ekspresije i svojstvima enzima postoji velika raznolikost fenotipova rezistencije koji su uočeni među ESBL-

pozitivnim izolatima (13). Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike, uključujući i karbapenem rezistentne enterobakterije. Prilagođeno prema (12).

#### 1.4. Karbapenemaze

Trenutno se tri skupine karbapenemaza KPC, NDM i OXA-48 smatraju trima glavnim  $\beta$ -laktamazama od epidemiološkog i kliničkog značaja, a osim ova tri enzima klinički značaj imaju i VIM, IMP i OXA-23 (11,14). Također, osim ovih  $\beta$ -laktamazama razlikujemo i  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL) kao i AmpC. Razlikujemo četiri molekularne klase kojima pripadaju ove  $\beta$ -laktamaze (15). Klase su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Molekularne klase  $\beta$ -laktamaza po Ambleru

Molekularna klasa	$\beta$ -laktamaza
A	KPC, ESBL
B	NDM, VIM, IMP
C	AmpC
D	OXA-48

KPC (*engl. Klebisella pneumoniae carbapenemase*) su karbapenemaze koje sadrže serinske ostatke i sastoje se od 265 - 269 aminokiselina (16). Bakterije koje proizvode ovaj enzim otporne su na velik broj antibiotika uključujući peniciline, cefalosporine, klasične inhibitore  $\beta$ -laktamaze poput klavulanske kiseline, sulbaktama i tazobaktama te na aztreonam i karbapeneme (14). Enterobakterije koje proizvode KPC otporne su na više antibiotika jer se gen *bla<sub>KPC</sub>* prenosi na velikim plazmidima s pratećim determinantama rezistencije koje uključuju i one odgovorne za otpornost na aminoglikozide, kinolone, trimetoprim, sulfonamide i tetracikline (16). Samim time, zbog svoje multirezistentnosti na antibiotike bakterije s KPC enzimima virulentnije su i opasnije za pacijente, posebice imunokompromitirane (17). KPC  $\beta$ -laktamaze inhibira fenilboronična kiselina koja se koristi u laboratorijskoj detekciji.

$\beta$ -laktamaze klase B koje se nazivaju i metalo- $\beta$ -laktamaze karakterizirane su potrebom za ionima cinka na njihovom aktivnom mjestu, a uključuju enzime NDM (*engl. New Delhi metallo-beta-lactamase*), VIM (*engl. Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*) i IMP koje su nazvane po svom fenotipu otpornom na imipenem (15). Uloge iona cinka u razgradnji antibiotika su vezanje supstrata, aktivacija hidrolize i stabilizacija međuprodukata reakcije (18).  $\beta$ -laktamaze klase B inhibirane su kelatorima metalnih iona poput EDTA. NDM enzimi se sastoje od 270 aminokiselina te sadrže dva iona cinka na aktivnom mjestu gdje se odvija hidroliza laktama. Supstitucije aminokiselina rezultirale su nastankom 24 različite varijante NDM enzima (19). VIM enzimi trenutno čine jednu od najvećih skupina metalo  $\beta$ -laktamaza, a sastoji od 46 prijavljenih varijanti koje se na temelju sličnosti aminokiselina mogu podijeliti u skupine: VIM-1, VIM-2, VIM-7, VIM-12 i VIM - 13 (18). IMP također pripada  $\beta$ -laktamazi klase B i ima aktivnost karbapenemaze, a kodirana je *bla<sub>IMP</sub>* genima. IMP razbija  $\beta$ -laktamski prsten koristeći cink kao katalizator. Do sada je otkriveno 88 varijanti IMP, a jedna od najčešćih je IMP-1 (20).

Oksacilinaze su enzimi koji hidroliziraju oksacilin, a među najčešćima je OXA-48  $\beta$ -laktamaza. OXA-48 je serinska  $\beta$ -laktamaza poput KPC-a, hidrolizira peniciline i karbapeneme, ali djelovanje enzima OXA-48 protiv karbapenema nije snažno kao djelovanje KPC-a i metalo- $\beta$ -laktamaza (14). Osim toga, pokazuje i vrlo slabu aktivnost protiv cefalosporina treće i četvrte generacije. OXA-48 prvi put je opisana kod *K. pneumoniae*, a kasnije se pojavila i u ostalim rodovima i vrstama enterobakterija poput *E. coli*, *S. marcescens*, *E. cloacae* (21). Do sada je pronađeno više od četrdeset varijanti OXA-48 enzima te više od trideset OXA-48-like enzima (22).

ESBL ( $\beta$ -laktamaze proširenog spektra) enzimi su koji hidroliziraju većinu penicilina i cefalosporina, uključujući ceftazidim, ceftriakson i cefotaksim, a njihovi geni šire se konjugacijskim prijenosom plazmida (23). Većina ESBL-a inhibirani su inhibitorima  $\beta$ -laktamaza poput klavulanske kiseline, sulbaktama, tazobaktama i avibaktama (13). ESBL najčešće pripadaju TEM, SHV i CTX-M porodicama, a TEM i SHV se najčešće nalaze kod bolničkih izolata, dok su CTX-M češći u izvanbolničkim izolatima. Najvažnija beta-laktamaza koja prevladava je TEM-1. a prema procjenama više od 90 % otpornosti na ampicilin među *E.coli* je povezano s prisutnošću TEM-1 (23). TEM-1 hidrolizira penicilin i cefalosporine prve generacije. Također, postoji i derivat TEM-1, nazvan TEM-2, a razlikuju se u jednoj aminokiselini. SHV-1, koji je prvobitno opisan u *K. pneumoniae*, odgovoran je za rezistenciju na ampicilin posredovanu plazmidom (23).

Cefalosporinaze AmpC tipa su  $\beta$ -laktamaze Amblerove klase C (13). Geni AmpC  $\beta$ -laktamaze prvi put su imenovani nakon otkrića *E. coli* otporne na ampicilin, a većinom se nalaze na plazmidima te se mogu pronaći kod većine gram-negativnih bakterija(24). AmpC  $\beta$ -laktamaze enzimi su koji posreduju u otpornosti na cefalotin, cefazolin, cefoksitin te većinu penicilina (25). AmpC slabo inhibiraju klasični ESBL inhibitori, posebice klavulanska kiselina. Brojne enterobakterije proizvode prirodne AmpC enzime. Također hiperprodukcija prirodnih AmpC je posljedica različitih genetskih promjena i daje visoku razinu otpornosti na cefalosporine i kombinacije inhibitora penicilin- $\beta$ -laktamaza (13). Mutacija gena uzrokuje pojačanu ekspresiju AmpC što uzrokuje otpornost na cefalosporine treće generacije (3).

## **1.5. Metode detekcije**

Nakon što se u rutinskim testovima osjetljivosti otkrije smanjena osjetljivost enterobakterije na karbapeneme, primjenjuju se fenotipske i genotipske metode detekcije i identifikacije karbapenemaza.

### **1.5.1. Fenotipski testovi**

Neki od najčešćih fenotipskih testova za detekciju karbapenem rezistentnih enterobakterija su metoda kombiniranih diskova, metoda dvostrukog diska, modificirani Hodgeov test, metoda inaktivacije karbapenema (CIM), Lateral Flow test, CARBA NP test, te MALDI-TOF. Metoda kombiniranih diskova koristi se za testiranje izoliranih enterobakterija na produkciju karabepenmaza.

Diskovi ili tablete koji dodajemo na Mueller Hinton agar na kojem se nalaze zasijane kulture sadrže meropenem ili imipenem te razne inhibitore. Inhibitori koji se koriste su borna kiselina koja inhibira karbapenemaze klase A, zatim etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) ili fenilboronična kiselina koja inhibira karbapenemaze klase B. OXA-48 inhibirana je avibaktamom, ali ovaj inhibitor do sada nije bio uključen u fenotipske ploče. Kao inhibitor AmpC koristi se kloksacilin (13). Ako se inhibicijska zona uveća za najmanje pet milimetara uz prisutnost inhibitora to upućuje da bakterija proizvodi karabapenemazu. S obzirom da je kod ove metode potrebna inkubacija tijekom noći, glavni nedostatak je dugotrajnost.

Metoda dvostrukog diska koristi se za detekciju ESBL sojeva. Suspenzija kulture zasijava se na Mueller Hinton agar nakon čega se dodaju diskovi koji sadrže azetronam i cefalosporine - ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson i cefepim. U sredinu ploče, dva do tri centimetra od ostalih diskova dodaje se disk s klavulanskom kiselinom, a nakon toga slijedi inkubacija do 24 sata na 37 °C. Ako se inhibicijska zona oko diskova širi prema disku s klavulanskom kiselinom rezultat je pozitivan, odnosno ispitivana bakterija proizvodi ESBL (3).

Kod modificiranog Hodgeovog testa suspenzija *E.coli* ATCC 25922 gustoće 0,5 po McFarlandu inokulira se na Mueller Hinton agar. Testirani soj se zatim zasijava potezom od centra do periferije ploče u četiri smjera nakon čega se stavlja disk karbapenema, najčešće imipenema od 10 mikrograma. Nakon toga slijedi inkubacija preko noći, a ako testni soj proizvodi karbapenemazu, imipenem u ploči se hidrolizira, dopuštajući osjetljivoj *E. coli* u pozadini da raste prema disku, stvarajući izgled poput lista djeteline (14). Korištenje modificiranog Hodgeovog testa ne preporuča se jer je teško interpretirati dobivene rezultate, specifičnost je slaba, a u nekim slučajevima osjetljivost ispod optimalne (13).

Princip metode inaktivacije karbapenema (CIM) je otkrivanje enzimske hidrolize inkubacijom karbapenema s bakterijskom suspenzijom (13). U CIM testu koriste se diskovi za testiranje osjetljivosti na antibiotike. Disk meropenema od 10 µg inkubira se u suspenziji ispitivanog soja. Nakon inkubacije, disk se izvadi iz otopine i stavi na Mueller Hinton agar ploču inokuliranu s *E. coli* ATCC 25922. Ako bakterija proizvodi karbapenemazu, meropenem u disku inaktiviran je tijekom početne inkubacije te dopušta rast *E. coli*. Ako se karbapenemaza ne proizvodi, formira se zona inhibicije. Osjetljivost ove metode je 99 %, a koristi se većinom za dokazivanje KPC, OXA-48, NDM, VIM i IMP karbapenemaza (14). Ovaj test lako je dostupan i znatno pristupačniji od molekularnih testova. Glavni nedostatak ove metode je dugotrajnost.



Lateral flow test je imunokromatografski test koji služi za detekciju i identifikaciju karbapenemaza iz izolata bakterijske kolonije (15). Test se temelji na imunološkom hvatanju epitopa karbapenemaza korištenjem nanočestica koloidnog zlata vezanih za nitroceluloznu membranu unutar uređaja s bočnim protokom. Na nitroceluloznoj membrani nalaze se linije monoklonskih antitijela protiv karbapenemaze OXA-48 i njenih varijanti, monoklonskih antitijela protiv KPC karbapenemaze, monoklonskih antitijela protiv NDM karbapenemaze te kontrolni reagens za hvatanje (26). Kada pufer koji sadrži resuspendirane bakterije dođe u kontakt s membranom, otopljeni konjugati migriraju s uzorkom pasivnom difuzijom te tako dolazi do kontakta s imobiliziranim antitijelima adsorbiranim na nitroceluloznu traku. Ako uzorak sadrži neku od karbapenemaza, epitopi određene karbapenemaze vezat će se za jednu od specifičnih linija. Rezultati ovog testa vidljivi su u roku 15 minuta u obliku crvene linije na testu.

CARBA NP test kolorimetrijski je test koji se temelji na izravnom otkrivanju hidrolize karbapenema kod bakterija koje proizvode karbapenemazu (27). Ovaj test sastoji se od traka dizajniranih za ispitivanje za jednog izolata koje sadrže unaprijed pripremljene reagense(28). Hidroliza karbapenema uzrokuje smanjenje pH vrijednosti što dovodi do promjene boje fenol red indikatora iz crvene u žutu. CARBA NP uglavnom pokazuje visoku specifičnost i osjetljivost za otkrivanje karbapenemaza klase A i klase B, ali nisku osjetljivost za OXA karbapenemaze. Kod određenih komercijalnih CARBA NP testova postoje problemi s tumačenjem rezultata na temelju vizualnog očitavanja pomaka boje zbog javljanja sumnjivih rezultata te određeni udio rezultata koji se ne mogu interpretirati (13). Ovaj test brzi je test s obzirom da su rezultati vidljivi u roku dva sata, a osim toga prednosti su i jednostavno korištenje te financijska isplativost.

MALDI-TOF (*engl. matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) masena spektrometrija postala je univerzalna referentna metoda za identifikaciju mikrobnih vrsta u kliničkoj mikrobiologiji, a uvođenje istog u laboratorije značajno je smanjilo vrijeme potrebno za identifikaciju bakterija. Razvoj algoritama za njihovu detekciju, implementiranih u komercijalno dostupan MALDI-TOF MS sustav, omogućio je automatiziranu trenutnu identifikaciju rezistentnih sojeva, tijekom standardnog procesa identifikacije vrsta (29).

Karbapenemaze se uz pomoć ove metode detektiraju tako da se kolonija testnog soja suspendira u otopini koja sadrži karbapenem i inkubira se na 37 °C od 15 minuta do nekoliko sati, a zatim uređaj detektira smanjenje ili nestanak određenih specifičnih pikova karbapenema u spektru masa.

Specifični pikovi u spektru mase bakterija identificirani su kao markeri otpornosti na antibiotike (29). Zabilježena je osjetljivost i specifičnost od gotovo 100 %, s vremenom obrade od 30 minuta. Međutim, prijavljeni su lažno negativni rezultati sa sojevima koji proizvode OXA-48 i sojevima koji proizvode sluz zbog interakcije s polisaharidima (14).

### 1.5.2. Genotipski testovi

PCR (*engl. Polymerase chain reaction*) često se koristi za detekciju gena koji kodiraju predominantne karbapenemaze: KPC, OXA-48, NDM, VIM i IMP. PCR u stvarnom vremenu otkriva i kvantificira gene rezistencije istovremeno koristeći fluorescentne sonde ili boje. Rezultati testa prikazuju se na ekranu kao fluorescentni intenzitet u odnosu na grafikon temperature taljenja koji se koristi u analizi krivulje taljenja. Svaki gen ima jedinstvenu krivulju taljenja koja se koristi za identifikaciju (30). Osim PCR-a u stvarnom vremenu koristi se i Multiplex PCR koji koristi skup više početnica za detekciju nekoliko gena istovremeno. Kombinacijom ove dvije metode moguće otkriti različite otpornosti gena u jednoj reakciji i za puno manje vremena (30). Postoje različiti komercijalni testovi poput GenExpert sustava koji koristi PCR u stvarnom vremenu za brzo otkrivanje *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub> karbapenemaze. Također, razvijen je i oligonukleotidni test temeljen na mikromrežama. Ovaj test istovremeno otkriva gene koji kodiraju klinički važne karbapenemaze, kao ESBL iz kulture unutar nekoliko sati (31).

Petljom posredovano izotermalno umnažanje brza je, jednostavna i visoko specifična metoda temeljena na umnažanju nukleinske kiseline. Ova metoda ovisi o autocikličkom pomaku lanca u sintezi DNA u prisutnosti Bst DNA polimeraze i skupa od četiri do osam početnica koje se pričvršćuju na različite dijelove DNA. Amplifikacija DNA promatra se mjerenjem zamućenosti reakcijske otopine spektrofotometrom ili fluorescentnim reagensom (30). U usporedbi sa PCR-om ova metoda ima veću osjetljivost.

DNA Sekvenciranje cijelog genoma je metoda za otkrivanje gena karbapenemaza koja može identificirati poznate i nepoznate gene koji kodiraju karbapenemaze sa 100 % osjetljivošću i specifičnošću u usporedbi s PCR-om (30). Glavni nedostatak sekvencioniranja cijelog genoma je nepostojanje univerzalne platforme za analizu podataka za jednostavnu usporedbu, analizu i razmjenu informacija.

## 2. CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. opisati osobitosti detekcije enterobakterija rezistentnih na karbapeneme (KRE) u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek u periodu 18. 5. 2020. - 18. 5. 2023.
2. ispitati učestalost enterobakterija u navedenom periodu
3. ispitati učestalost enterobakterija rezistentnih na karbapeneme (KRE)
4. odrediti udio entereobakterija rezistentnih na karbapeneme (KRE) od ukupno izoliranih enterobakterija u navedenom periodu
5. ispitati distribuciju detektiranih karbapenemaza po bakterijskim vrstama

### **3. MATERIJALI I METODE RADA**

#### **3.1. Ustroj studije**

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija.

#### **3.2. Etička načela**

Istraživanje je odobreno 20. ožujka 2023. od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (URBROJ: 2158-61-46-23-48).

#### **3.3 Kulture enterobakterija i testiranje rezistencije na karbapeneme**

U istraživanju je korišteno 206 izolata enterobakterija rezistentnih na karbapeneme koje su detektirane i pohranjene u razdoblju 18. 05. 2020. - 18. 05. 2023. u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek. Osim izolata, u istraživanju su korišteni i podaci o datumu uzorkovanja uzoraka u kojem su detektirane karbapenemaze, kriptirani broj uzoraka, vrste uzoraka, nazivi izolata te detektirani enzimi. Također, korišteni su i podaci o ukupnom broju izoliranih enterobakterija kao i podaci o broju izoliranih ostalih porodica bakterija u navedenom periodu. Svi navedeni podaci dobiveni su iz elektronske baze Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek. Bolesnici kod kojih su izolirane enterobakterije rezistentne na karbapeneme i njihovi osobni podaci ni na koji način nisu korišteni u istraživanju. Tijekom navedenog razdoblja provedena je obrada različitih kliničkih uzoraka u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek standardiziranim

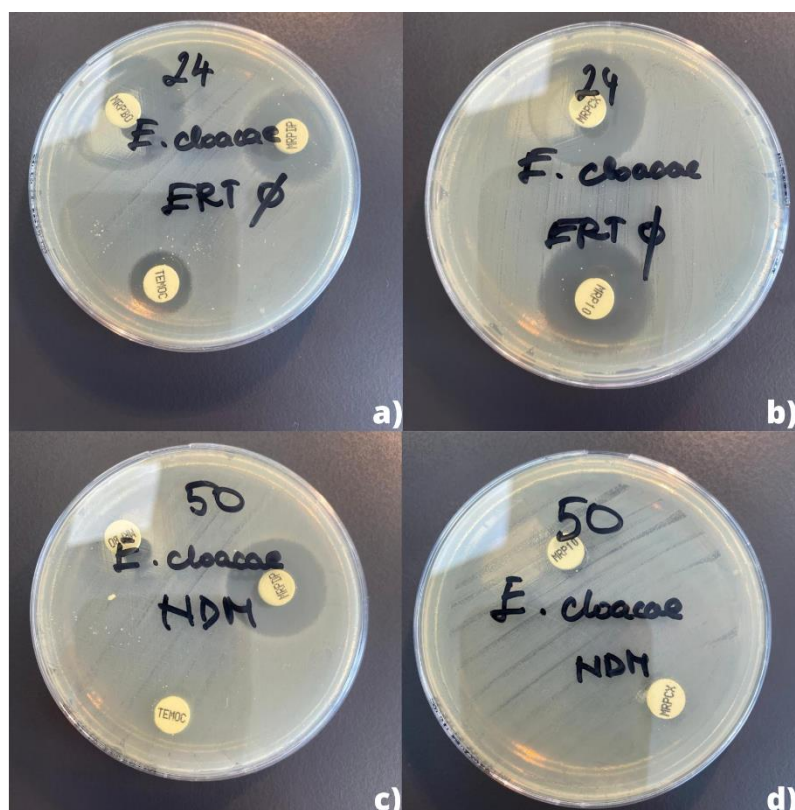
metodama izolacije i identifikacije enterobakterija te ispitivanje osjetljivosti na antibiotike. Za testiranje rezistencije enterobakterija na karbapeneme provedeni su fenotipski i genotipski testovi. Od fenotipskih testova provedeni su: metoda kombiniranih diskova, Lateral Flow test, CARBA NP test, modificirani Hodgeov test te metoda inaktivacije karbapenema (CIM). Genotipski test korišten za testiranje rezistencije na karbapeneme je eazyplex SuperBug CRE (AmplexDiagnostics GmbH, Njemačka).

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Metoda kombiniranih diskova

Kod metode kombiniranih diskova dodajemo tablete ili diskove na Mueller Hinton agar na kojem se nalaze zasijane kulture. Za dokazivanje karbapenemaza korišten je KPC, MBL, and OXA-48 Confirm Kit (Rosco diagnostica) koji sadrži: meropenem 10  $\mu\text{g}$  (MRP), meropenem 10  $\mu\text{g}$  + fenilborična kiselina(MRPBO), meropenem 10  $\mu\text{g}$  + kloksacilin(MRPCX), meropenem 10  $\mu\text{g}$  + dipikolinska kiselina(MRPDP) i temocilin 30  $\mu\text{g}$ .

**Postupak:** Koristeći svježu kulturu pripremi se suspenzija testirane bakterije gustoće 0,5 po McFarlandu. Sterilnim brisom suspenziju se jednoliko zasijava na Mueller Hinton agar. Dispenserom za tablete rasporede se tablete na inokuliranu podlogu. Zatim slijedi inkubacija na  $35\pm 1$  °C preko noći. Nakon inkubacije mjeri se i zapisuje dijametar inhibicijske zone te se uspoređuju inhibicijske zone svih tableta. Prvo se mjeri inhibicijska zona oko tablete meropenema, a zatim oko ostalih tableta. Ako su sve zone 3 mm jedne od drugih, organizam ne luči KPC i metalo-  $\beta$ -laktamaze. Ako je zona inhibicije oko MRPCX  $\geq 5$  mm, a oko MRPBO  $\geq 4$  mm riječ je o hiperprodukciji AmpC. Ako je zona inhibicije oko MRPBO  $\geq 4$  mm, a zona MRPCX  $\leq 3$  mm postoji aktivnost KPC enzima. Ako je zona oko MRPBO diska  $\geq 4$  mm od zone MRPCX izolat proizvodi KPC. Ako je zona oko diska MRPDP  $\geq 5$  mm od zone oko diska MRP10 izolat je metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivan. Također, neki izolati mogu imati minimalnu inhibitornu koncentraciju na meropenem manju od 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ali i dalje proizvoditi karbapenemaze te se za njihovu detekciju koristi disk imipenema i meropenema te disk dipikolične kiseline između njih. Sinergizam između dipikolične kiseline i diska imipenema i/ili meropenema ukazuje na prisutnost metalo  $\beta$ -laktamaze. Ako je zona inhibicije oko tablete temocilina  $< 14$  mm, a izolat je KPC i MBL negativan, izolat je OXA-48 pozitivan. Također, moguće je da izolat može biti pozitivan na više mehanizama rezistencije. Na primjer, ako je zona inhibicije oko diska MRPDP  $\geq 5$  mm, a zona inhibicije oko diska MRPBO  $\geq 4$  mm organizam je MBL i KPC pozitivan. Rezultati metode kombiniranih diskova prikazani su na Slici 2.



Slika 2.

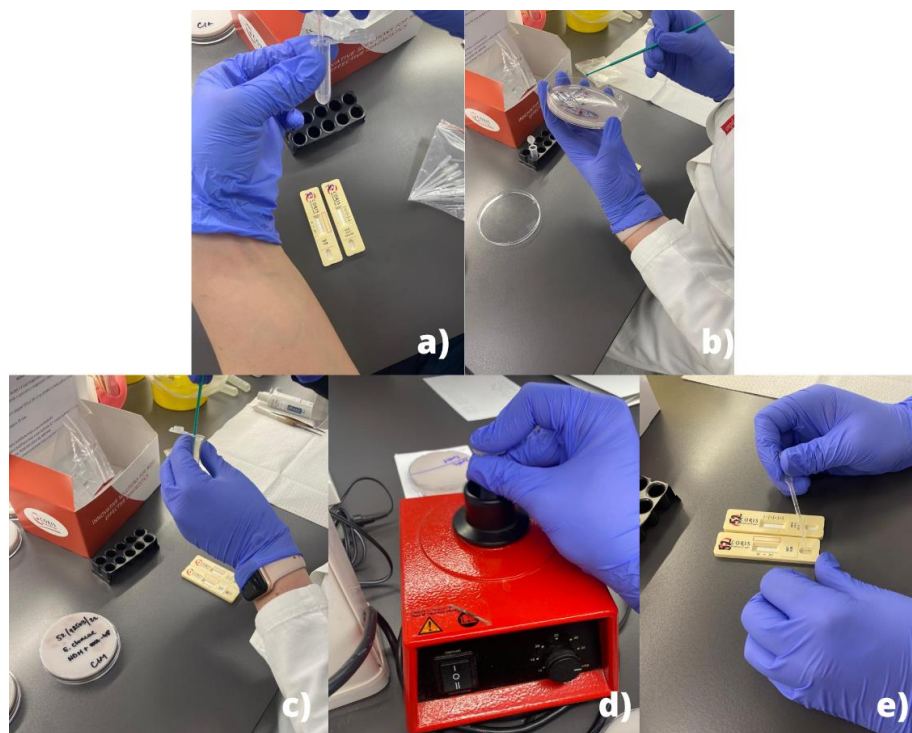
a) i b) Jasno vidljive zone inhibicije - izolat osjetljiv na antibiotik

c) i d) Zona oko diska MRPDP  $\geq 5$  mm od zone oko diska MRP10 – izolat metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivan

### 3.4.2. Lateral flow test

Za dokazivanje KPC, OXA-48, NDM I VIM karbapenemaza korišten je komercijalni O.K.N.V.I RESIST-5 lateral flow test (Coris BioConcept). Ovaj test brzi je dijagnostički test za detekciju karbapenemaza iz bakterijske kulture.

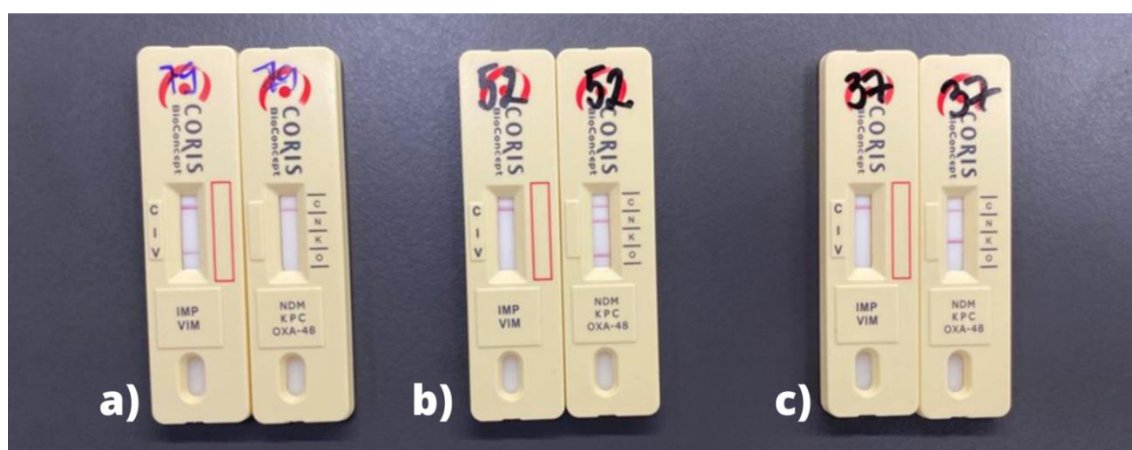
**Postupak:** U epruvetu se dodaje 11 kapi LY-D pufera te se zatim ezom uzima uzorak bakterijske kolonije porasle na Mueller Hinton agaru i promiješa se. Nakon toga slijedi vorteksiranje kako bi došlo do homogenizacije. Zatim se pipetira 100 mikrolitara mješavine pufera i bakterijske kolonije u svaku jažicu na obje kazete (Slika 3.) Rezultati testa vidljivi su nakon 15 minuta u obliku crvene linije na testu (Slika 4.).



Slika 3. Postupak O.K.N.V.I RESIST-5 lateral flow testa.

- a) Dodavanje kapi LY-D pufera
- b) Uzimanje uzorka ezom
- c) Dodavanje uzorka u pufer
- d) Vorteksiranje
- e) Pipetiranje u jažice

Izvor: fotografirala autorica rada



Slika 4. Rezultati O.K.N.V.I RESIST-5 lateral flow testa. Kod tri različita izolata detektirane su karbapenemaze: a) VIM, b) NDM i OXA-48 i c) KPC.

Izvor: fotografirala autorica rada.

### 3.4.3. Carba NP test

Za dokazivanje prisutnosti karbapenemaza u izolatima korišten je RAPIDEC CARBA NP test (bioMérieux). CARBA NP test temelji se na izravnom otkrivanju hidrolize karbapenema. Ovaj test brzi je dijagnostički test s obzirom da su rezultati vidljivi kroz dva sata.

**Postupak:** 100  $\mu$ L API suspenzijskog medija pipetira se u jažice označene slovima a, b i c na traci za ispitivanje te se pričeka 10 minuta. Zatim se u jažicu označenu slovom c ezom dodaje uzorak bakterijske kolonije porasle na Mueller Hinton agaru i promiješa se te se ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi poklopljeno poklopcem za inkubaciju dobivenim u kitu. Nakon 30 minuta iz jažice označene slovom c pipetiramo 25  $\mu$ L mješavine suspenzijskog medija i uzorka bakterijske kolonije u jažice označene slovima d i e. Nakon toga iz jažice a pipetiramo 25  $\mu$ L phenol red indikatora u jažice označene slovima d i e. Traku za ispitivanje pokrивamo poklopcem za inkubaciju te stavljamo u termostat na temperaturu 37 °C. Promjena boje iz crvene u narančastu ili žutu znak je prisutnosti karbapenemaza. Rezultati testa vidljivi su unutar 2 sata.



Slika 5. Rezultati RAPIDEC CARBA NP testa. Promjena boje iz crvene u žuto ukazuje na prisutnost karbapenemaze. Izvor: fotografirala autorica rada.





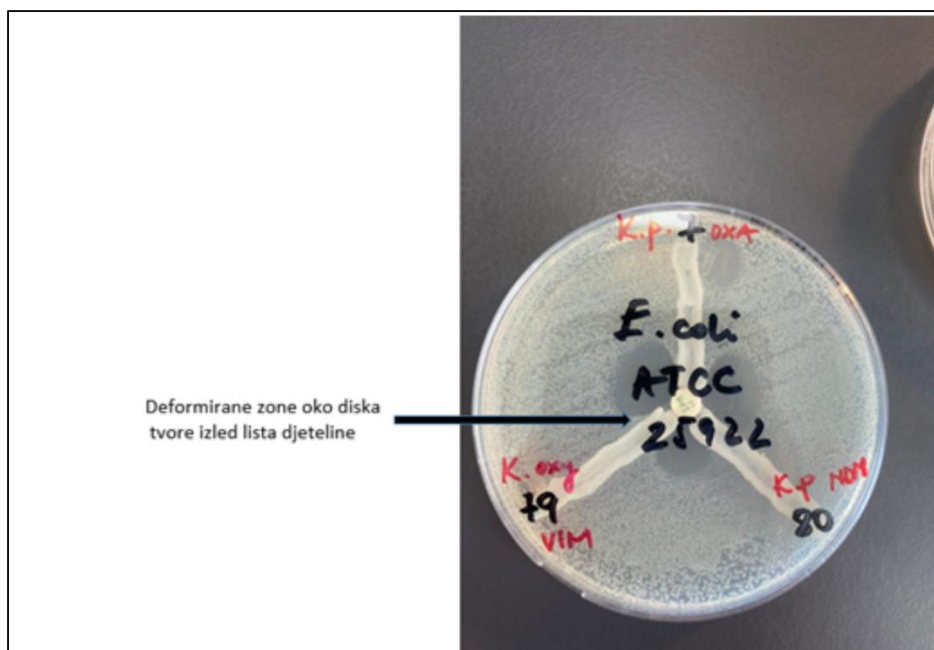
Slika 6. Rezultati RAPIDEC CARBA NP testa. Boja je nepromijenjena što ukazuje da karbapenemaza nije prisutna.

Izvor: fotografirala autorica rada

#### 3.4.4. Modificirani Hodgeov test

Modificirani Hodgeov test uključuje povlačenje linija kliničkog izolata od diska impregniranog ertapenemom ili imipenemom prema periferiji ploče na koju je prethodno zasijan soj *E. coli* osjetljiv na karbapenem.

**Postupak:** Suspenzija *E. coli* ATCC 25922 gustoće 0,5 po McFarlandu inokulira se na Mueller Hinton agar te se zatim zasijava soj koji se testira. Soj se zasijava na način da se od sredine prema periferiji ploče povuku dvije ili tri linije. Nakon zasijavanja, u sredinu ploče se stavlja disk imipenema od 10 µg. Ploče se zatim stavljaju na inkubaciju preko noći. Ako je inhibicijska zona oko diska deformirana, odnosno izgleda poput lista djeteline, testirani soj proizvodi karbapenemazu (Slika 7.)



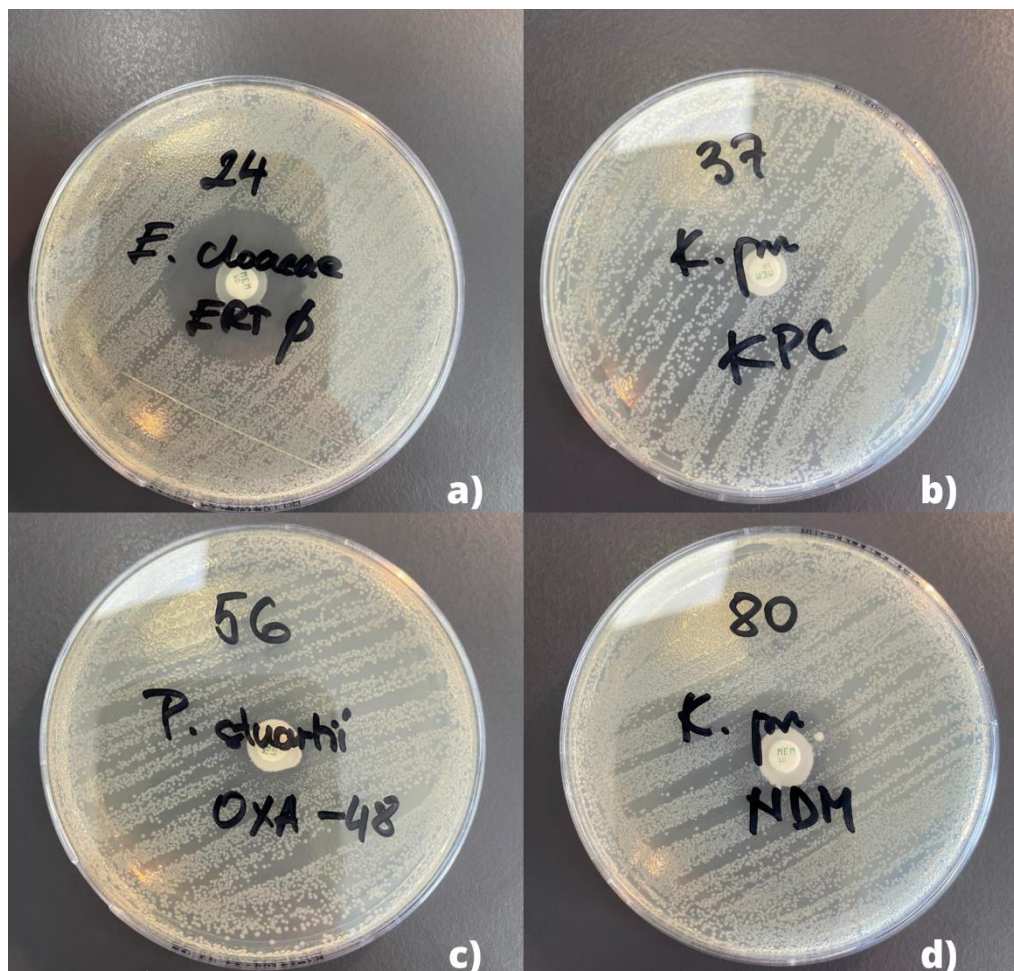
Slika 7. Deformirana inhibicijska zona ukazuje da soj proizvodi karbapenemazu

Izvor: fotografirala autorica rada

### 3.4.5. Metoda inaktivacije karbapenema (CIM)

Metodom inaktivacije karbapenema (CIM) detektira se produkcija karbapenemaza u ispitivanom soju na temelju enzimske hidrolize.

**Postupak:** U epruvetu pipetira se 400  $\mu\text{L}$  sterilne fiziološke otopine te zatim umuti punu ušicu soja kod kojeg se ispituje proizvodnja karbapenemaza. Nakon toga dodaje se disk meropenema od 10  $\mu\text{g}$ . Disk se zatim inkubira 2 sata u suspenziji na temperaturi od 35  $^{\circ}\text{C}$ . Suspenzija *E.coli* ATCC 25922 inokulira se na Mueller Hinton agar na koji se nakon inkubacije stavlja disk meropenema. Ploča sa diskom meropenema ponovo se inkubira na 35  $^{\circ}\text{C}$  preko noći te se zatim promatra prisutnost odnosno odsutnost zone inhibicije (Slika 8.). Ukoliko nema inhibicijske zone, testirani soj proizvodi karbapenemazu koja inhibira djelovanje karbapenema te omogućuje rast inokuliranoj *E.coli* oko diska meropenema.



Slika 8. Metoda inaktivacije karbapenema

- a) Inhibicijska zona - soj ne proizvodi karbapenemazu
- b) Nema inhibicijske zone - soj proizvodi karbapenemazu
- c) Nema inhibicijske zone - soj proizvodi karbapenemazu
- d) Nema inhibicijske zone - soj proizvodi karbapenemazu

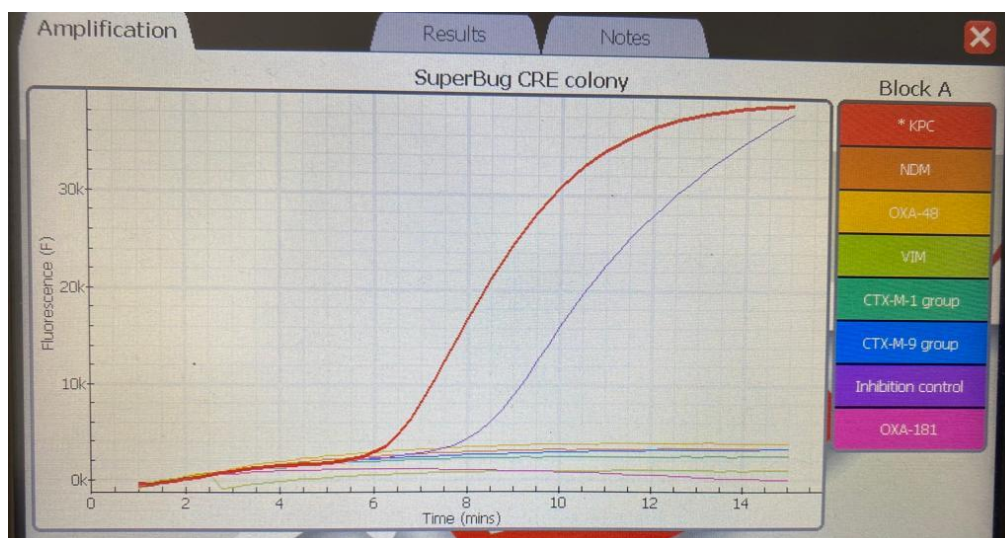
Izvor: fotografirala autorica rada

### 3.4.6. Genotipski test

Za detekciju bakterijskih gena korišten je molekularni test eazyplex SuperBug CRE (AMPLEX).

**Postupak:** Uzorak bakterijske kolonije uzme se inokulacijskom ezom te se stanice suspendiraju u 500  $\mu$ L RALF medija. Otopina se zatim inkubira 2 minute na 99 °C. Na zaslonu uređaja unosi se barkod uzorka te se odabire blok u koji ide strip.

Nakon inkubacije, u svaku od 8 jažica na stripu pipetira se 25  $\mu$ L otopine te se odmah nakon strip postavlja u odabrani blok uređaja, zatvara se poklopac i uređaj započinje test. Rezultati su prikazani u obliku krivulja, a svaki gen ima jedinstvenu krivulju taljenja koja se koristi za identifikaciju (Slika 9.).



Slika 9. Rezultati molekularnog testa eazyplex SuperBug CRE. Krivulja obojena crveno ukazuje da testirani izolat posjeduje gen za KPC.

Izvor: fotografirala autorica rada

### 3.5. Statističke metode

Rezultati istraživanja prikazani su grafički i tabelarno te su obrađeni deskriptivnom statistikom. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnom i relativnom frekvencijom. Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilk testom, a razina značajnosti podešena je na  $\alpha=0,5$ . S obzirom da podaci testirani Shapiro-Wilk testom nisu slijedili normalu, opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Statistička obrada podataka provedena je u programu RStudio, inačica 2023.03.1.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Učestalost enterobakterija u periodu od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023.

Tablica 2. Učestalost enterobakterija po godinama

Enterobakterije	Shapiro-Wilk test (p-vrijednost)	Medijan	Interkvartilni raspon
2020.	$1,355 \cdot 10^{-10}$	7,00	21,00
2021.	$4,591 \cdot 10^{-11}$	7,00	27,00
2022.	$4,478 \cdot 10^{-11}$	5,00	31,00
2023.	$2,591 \cdot 10^{-10}$	5,00	15,75

Normalnost uzorka testirana je Shapiro-Wilk testom. Dobivene p-vrijednosti su sve manje od 0.05, što znači da na razini značajnosti  $\alpha=0.05$  ne možemo tvrditi da se radi o normalno distribuiranim uzorcima za svaku godinu.

Tablica 3. Učestalost enterobakterija rezistentnih na karbapaneme po godinama

Enterobakterije rezistentne na karbapaneme	Shapiro-Wilk test (p-vrijednost)	Medijan	Interkvartilni raspon
2020.	$7,028 \cdot 10^{-8}$	4,00	0,50
2021.	$4,254 \cdot 10^{-11}$	2,00	7,75
2022.	$2,56 \cdot 10^{-10}$	5,00	22,25
2023.	$2,2 \cdot 10^{-16}$	6,00	3,00

Normalnost uzorka testirana je Shapiro-Wilk testom. Dobivena p-vrijednosti su sve redom manje od 0.05, što znači da na razini značajnosti  $\alpha=0.05$  ne možemo tvrditi da se radi o normalno distribuiranim uzorcima za svaku godinu.

U periodu od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023. detektirano je ukupno 9207 izolata od čega udio detektiranih enterobakterija iznosi 55,58 %. Frekvencija detekcije enterobakterija u ispitivanom periodu prikazana je u Tablici 4.

Tablica 4. Broj i udio svih enterobakterija od svih ukupno detektiranih bakterija po godinama

Godina	Ukupan broj izolata (n)	Broj enterobakterija (n)	Udio (%)
2020.	1592	888	55,78
2021.	2735	1583	57,88
2022.	3249	1904	58,60
2023.	1631	743	45,56
UKUPNO	9207	5118	55,58

U 2020. godini detektirano je 888 enterobakterija. Distribucija detektiranih enterobakterija prikazana je u Tablici 5. u kojoj jasno vidimo dominaciju izolata *E. coli* zastupljene sa 55,07 %.

Tablica 5. Broj detektiranih enterobakterija po rodovima i udio istih od ukupnog broja enterobakterija za 2020. godinu

Rod	Broj (n)	Udio (%)
<i>Citrobacter spp.</i>	17	1,91
<i>Enterobacter spp.</i>	64	7,21
<i>Escherichia spp.</i>	489	55,07
<i>Klebsiella spp.</i>	173	19,48
<i>Morganella spp.</i>	11	1,24
<i>Proteus spp.</i>	103	11,60
<i>Providencia spp.</i>	15	1,69
<i>Salmonella spp.</i>	2	0,23
<i>Serratia spp.</i>	14	1,58
UKUPNO	888	100

U 2021. godini detektirano je ukupno 1583 enterobakterije, a distribucija bakterija prikazana u Tablici 6. jasno prikazuje dominaciju *E. coli* koja je zastupljena sa 57,99 %.

Tablica 6. Broj detektiranih enterobakterija po rodovima i udio istih od ukupnog broja enterobakterija za 2021. godinu

Rod	Broj (n)	Udio (%)
<i>Citrobacter spp.</i>	35	2,21
<i>Enterobacter spp.</i>	125	7,90
<i>Escherichia spp.</i>	918	57,99
<i>Klebsiella spp.</i>	290	18,32
<i>Morganella spp.</i>	17	1,07
<i>Proteus spp.</i>	156	9,85
<i>Providencia spp.</i>	6	0,38
<i>Salmonella spp.</i>	1	0,06
<i>Serratia spp.</i>	35	2,21
UKUPNO	1583	100

U 2022. godini broj ukupan broj detektiranih enterobakterija iznosio je 1904. Distribucija po rodovima prikazana u Tablici 7. ukazuje na dominaciju *E.coli* koja je zastupljena sa 52,68 %.

Tablica 7. Broj detektiranih enterobakterija po rodovima i udio istih od ukupnog broja enterobakterija za 2022. godinu

Rod	Broj (n)	Udio (%)
<i>Citrobacter spp.</i>	56	2,94
<i>Enterobacter spp.</i>	129	6,78
<i>Escherichia spp.</i>	1003	52,68
<i>Klebsiella spp.</i>	389	20,43
<i>Morganella spp.</i>	26	1,37
<i>Proteus spp.</i>	231	12,13
<i>Providencia spp.</i>	19	1,00
<i>Salmonella spp.</i>	2	0,11
<i>Serratia spp.</i>	49	2,57
UKUPNO	1904	100

U 2023. godini detektirano je 743 enterobakterija. Distribucija detektiranih enterobakterija prikazana je u Tablici 8. u kojoj jasno vidimo dominaciju izolata *E. coli* zastupljene sa 55,32 %.

Tablica 8. Broj detektiranih enterobakterija po rodovima i udio istih od ukupnog broja enterobakterija za 2023. godinu

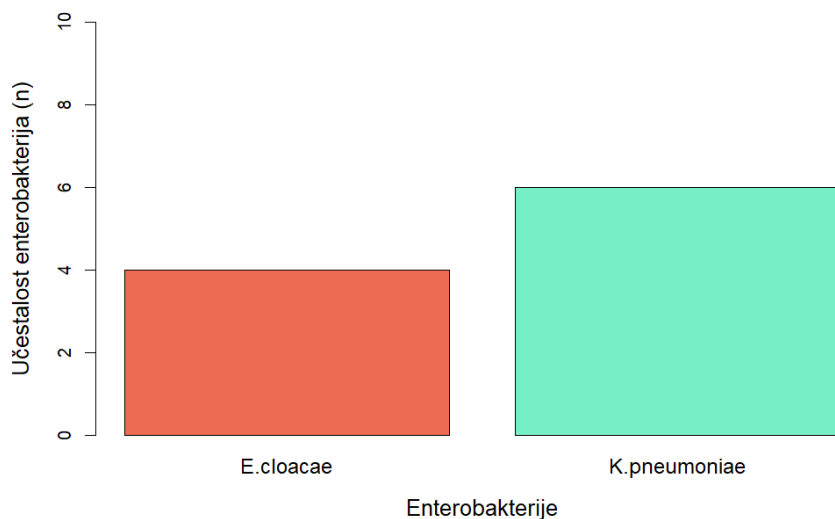
Rod	Broj (n)	Udio (%)
<i>Citrobacter spp.</i>	27	3,63
<i>Enterobacter spp.</i>	25	3,36
<i>Escherichia spp.</i>	411	55,32
<i>Klebsiella spp.</i>	162	21,80
<i>Morganella spp.</i>	7	0,94
<i>Pantonea spp.</i>	1	0,13
<i>Proteus spp.</i>	83	11,17
<i>Providencia spp.</i>	4	0,54
<i>Salmonella spp.</i>	2	0,27
<i>Serratia spp.</i>	21	2,83
UKUPNO	743	100



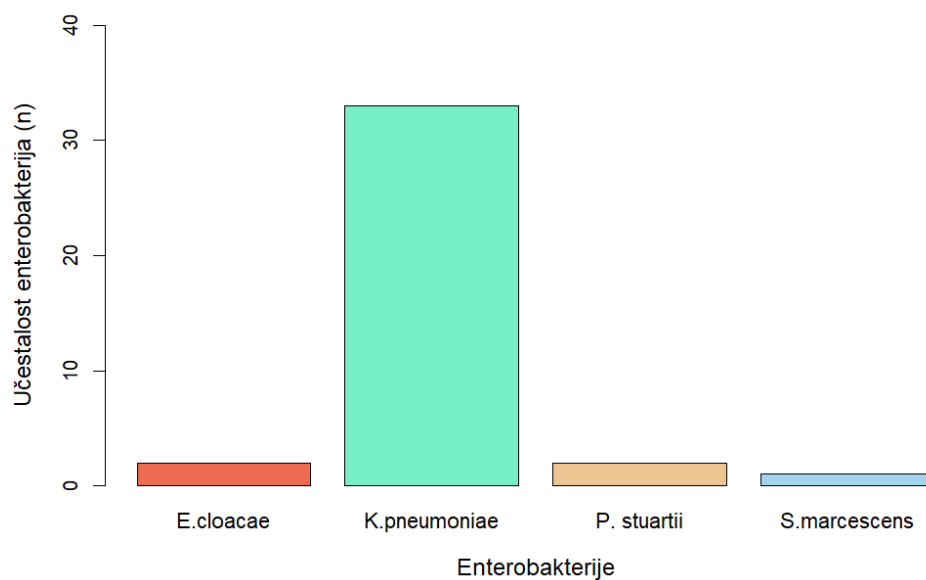
#### 4.2. Broj i udio enterobakterija rezistentnih na karbapeneme

Tablica 9. Broj i udio enterobakterija rezistentnih na karbapeneme po godinama

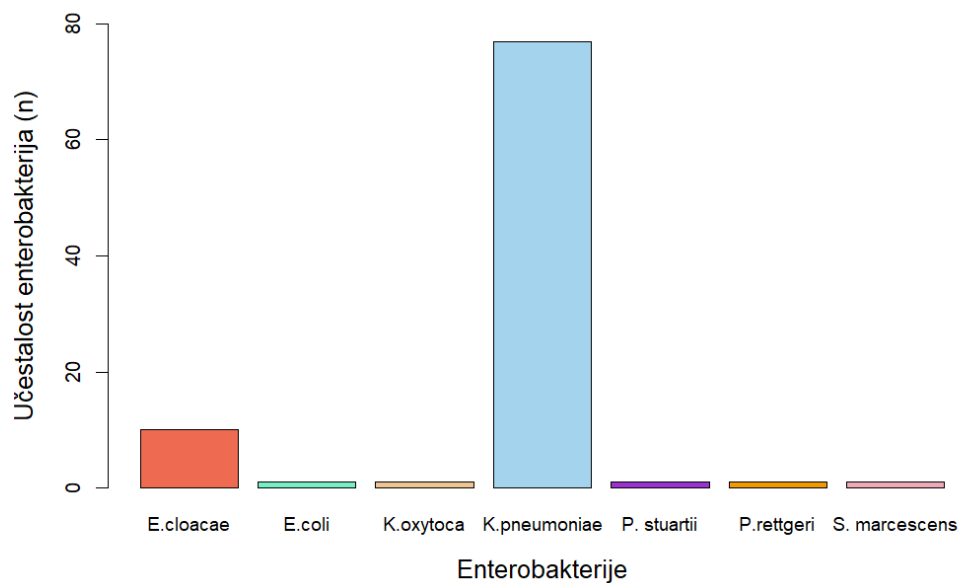
<b>GODINA</b>	<b>IZOLAT</b>	<b>Broj (n)</b>	<b>Udio (%)</b>
<b>2020.</b>	<i>E. cloacae</i>	4	40
	<i>K.pneumoniae</i>	6	60
UKUPNO		10	100
<b>2021.</b>	<i>E. cloacae</i>	2	5,26
	<i>K.pneumoniae</i>	33	86,84
	<i>P. stuartii</i>	2	5,26
	<i>S.marcescens</i>	1	2,63
UKUPNO		38	100
<b>2022.</b>	<i>E. coli</i>	1	1,09
	<i>E. cloacae</i>	9	9,89
	<i>K.pneumoniae</i>	77	84,62
	<i>K. oxytoca</i>	1	1,09
	<i>P. rettgeri</i>	1	1,09
	<i>P. stuartii</i>	1	1,09
	<i>S. marcescens</i>	1	1,09
UKUPNO		91	100
<b>2023.</b>	<i>E. cloacae</i>	1	1,50
	<i>K.pneumoniae</i>	66	98,50
UKUPNO		67	100



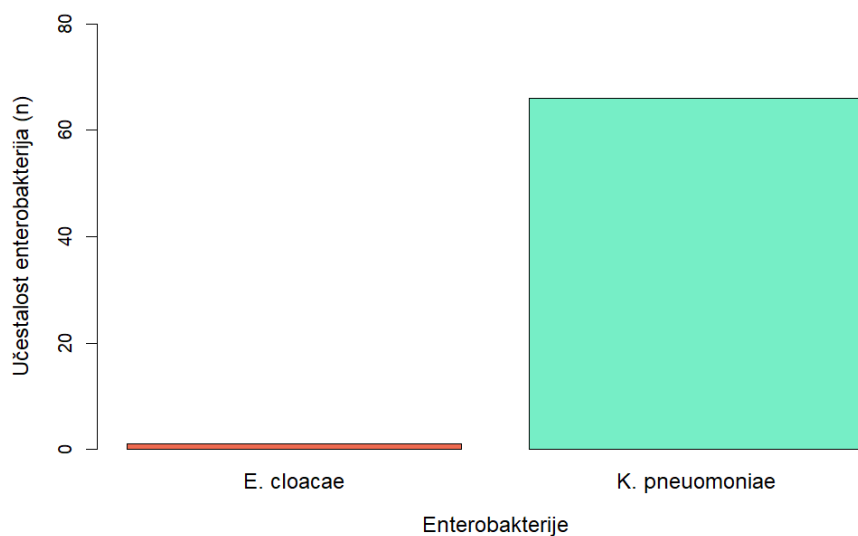
Slika 10. Stupičasti dijagram frekvencija enterobakterija rezistentnih na karbapeneme za 2020. godinu



Slika 11. Stupičasti dijagram frekvencija enterobakterija rezistentnih na karbapeneme za 2021. godinu



Slika 12. Stupičasti dijagram frekvencija enterobakterija rezistentnih na karbapeneme za 2022. godinu



Slika 13. Stupičasti dijagram frekvencija enterobakterija rezistentnih na karbapeneme za 2023. godinu

### 4.3. Broj i udio karbapenem rezistentnih enterobakterija(KRE) i osjetljivih enterobakterija

Tablica 10. Broj i udio karbapenem rezistentnih enterobakterija i osjetljivih enterobakterija po godinama

GODINA	Ukupan broj detektiranih enterobakterija	Rezistentne		Osjetljive	
		Broj (n)	Udio (%)	Broj (n)	Udio (%)
2020.	888	10	1,13	878	98,87
2021.	1583	38	2,40	1545	97,60
2022.	1904	91	4,78	1813	95,22
2023.	743	67	9,02	676	90,98

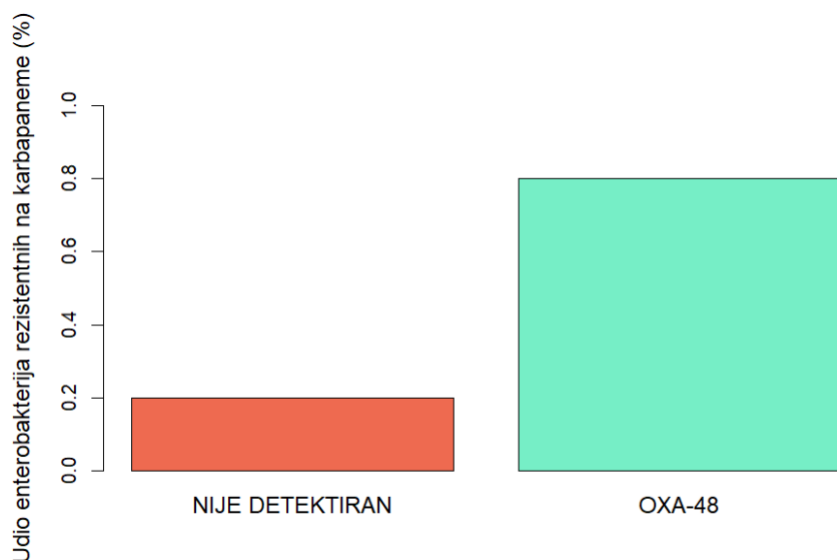
Tablica 11. Ukupan broj i udio detektiranih rezistentnih i osjetljivih enterobakterija za razdoblje od 18.05.2020. do 18.05.2023.

	Rezistentne		Osjetljive	
	Broj (n)	Udio (%)	Broj (n)	Udio (%)
Enterobakterije	206	4,19	4909	95,80

### 4.4. Prisutnost karbapenemaza

Tablica 12. Broj i udio detektiranih karbapenemaza za 2020. godinu

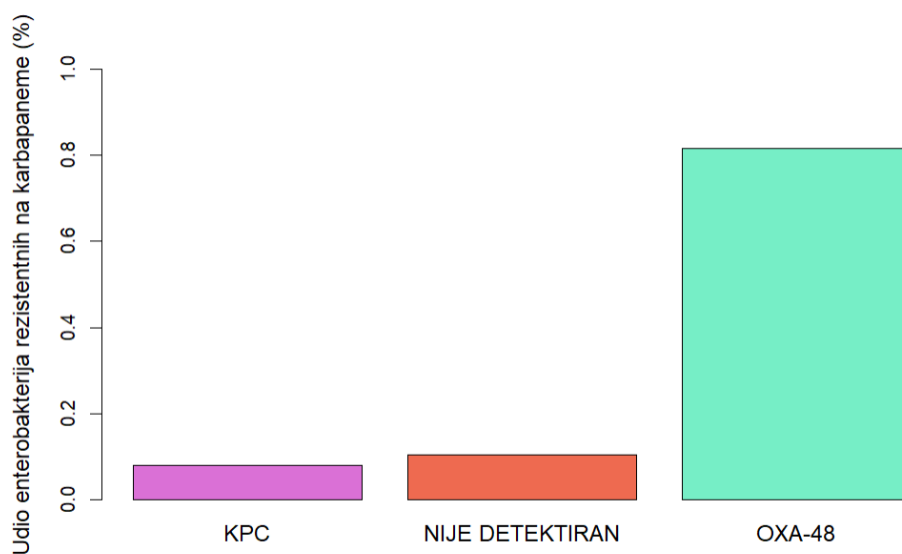
Prisutnost karbapenemaze	Broj (n)	Udio (%)
NIJE DETEKTIRANA	2	20
OXA-48	8	80
Ukupno	10	100



Slika 14. Stupičasti dijagram udjela karbapenemaza za 2020. godinu

Tablica 13. Broj i udio detektiranih karbapenemaza za 2021. godinu

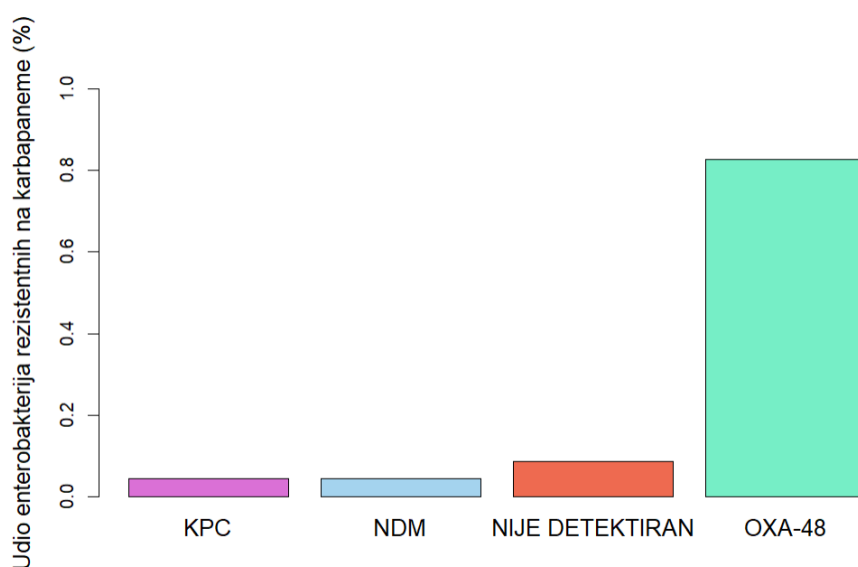
Prisutnost karbapenemaze	Broj (n)	Udio (%)
KPC	3	7,89
NIJE DETEKTIRANA	4	10,53
OXA-48	31	81,58
Ukupno	38	100



Slika 15. Stupičasti dijagram udjela karbapenemaza za 2021. godinu

Tablica 14. Broj i udio detektiranih karbapenemaza za 2022. godinu

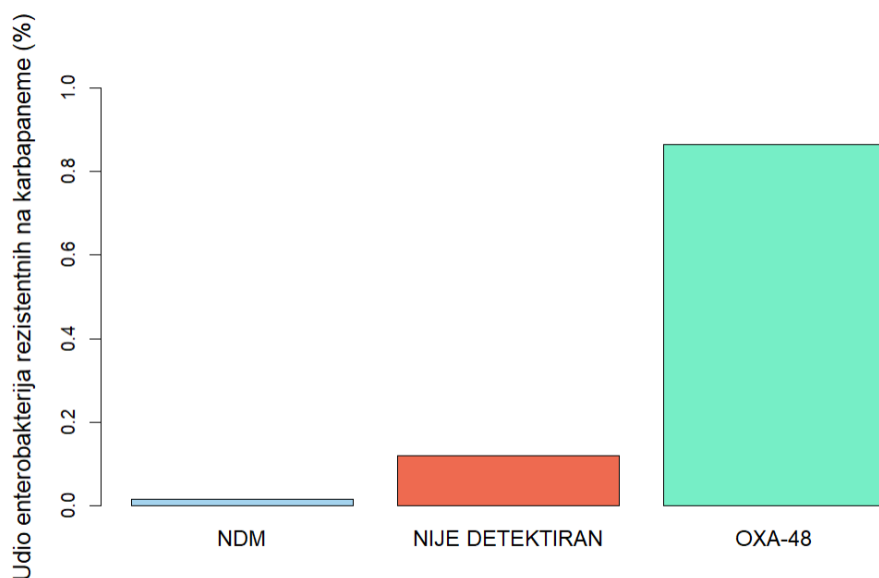
Prisutnost karbapenemaze	Broj (n)	Udio (%)
KPC	4	4,35
NDM	4	4,35
NIJE DETEKTIRANA	8	8,70
OXA-48	76	82,60
Ukupno	92	100



Slika 16. Stupičasti dijagram udjela karbapenemaza za 2022. godinu

Tablica 15. Broj i udio detektiranih karbapenemaza za 2023. godinu

Prisutnost karbapenemaze	Broj (n)	Udio (%)
NDM	1	1,49
NIJE DETEKTIRANO	8	11,94
OXA-48	58	86,57
Ukupno	67	100



Slika 17. Stupičasti dijagram udjela karbapenemaza za 2023. godinu

Tablica 16. Broj i zastupljenost pojedinih enzima po godinama

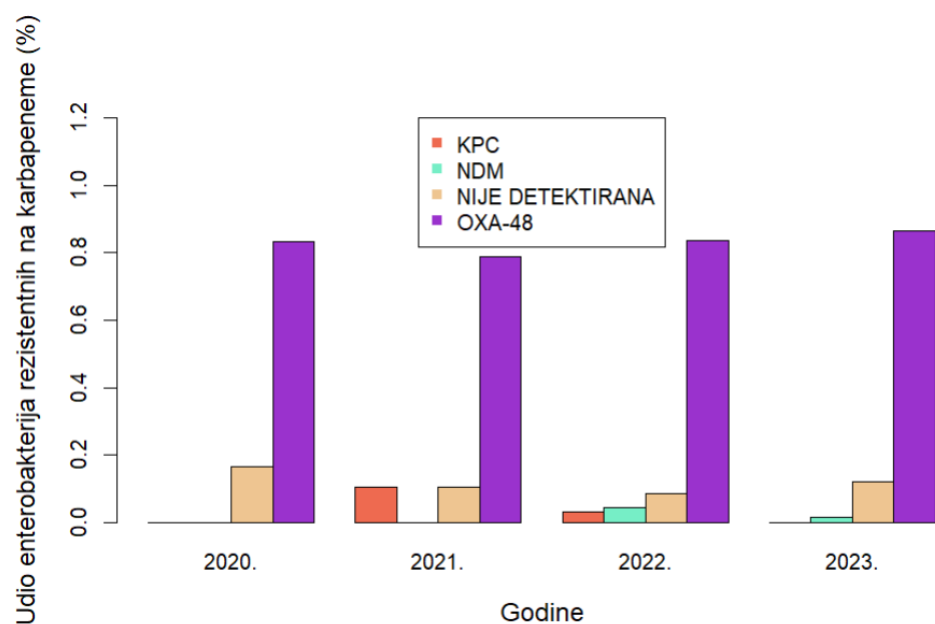
Godina	KPC	NDM	VIM	NIJE DETEKTIRANO	OXA-48	Ukupno
2020.	0 (0%)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (9,10 %)	8 (4,62%)	10
2021.	3 (42,86%)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (18,18%)	31 (17,92%)	38
2022.	4 (57,14%)	4 (80 %)	0 (0 %)	8 (36,36%)	76 (43,93%)	92
2023.	0 (0 %)	1 (20 %)	0 (0 %)	8 (36,36%)	58 (33,52%)	67
Ukupno	7	5	0	22	173	207

Tablica 17. Udio (%) enzima sveukupno po godinama

Naziv enzima	2020.	2021.	2022.	2023.
KPC	0	10,53	3,30	0
NDM	0	0	4,40	1,52
NIJE	16,67	10,53	8,79	12,12

## DETEKTIRANA

OXA-48	83,33	78,95	83,52	86,36
--------	-------	-------	-------	-------



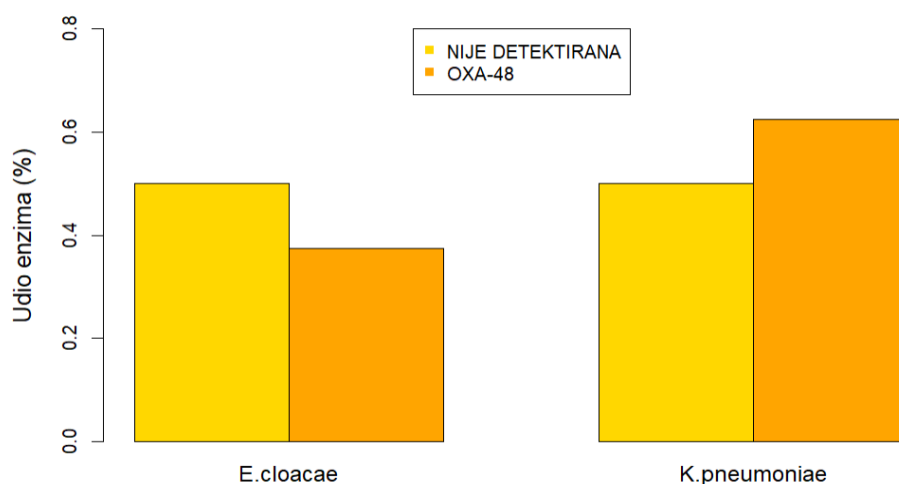
Slika 18. Stupičasti dijagram udjela karbapenemaza po godinama

**4.5. Distribucija enzima po vrstama enterobakterija po godinama**

Tablica 18. Broj i distribucija enzima po vrstama enterobakterija za 2020. godinu

	<i>E.cloacae</i>	<i>K.pneumoniae</i>
NIJE DETEKTIRANA	1 (50 %)	1 (50 %)
OXA-48	3 (37,5 %)	5 (62,5 %)

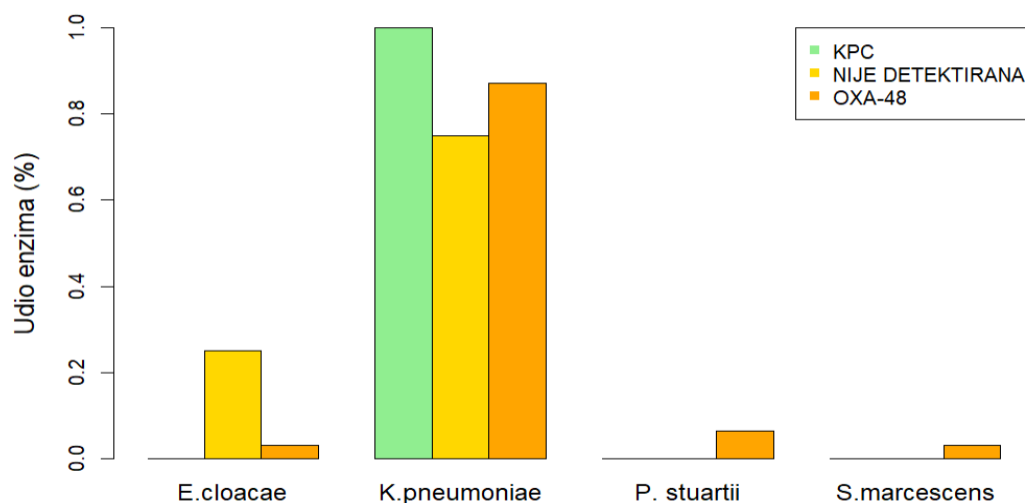




Slika 19. Stupičasti dijagram distribucije enzima po vrstama enterobakterija za 2020. godinu

Tablica 19. Broj i distribucija enzima po vrstama enterobakterija za 2021. godinu

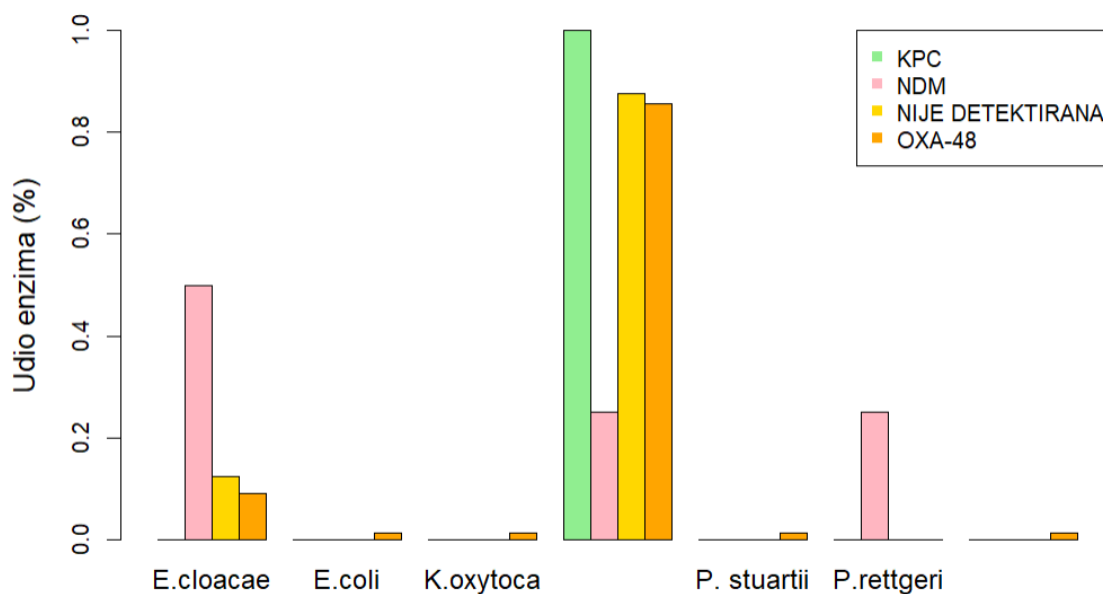
	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>S. marcescens</i>
KPC	0 (0 %)	3 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
NIJE DETEKTIRANA	1 (25 %)	3 (75 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
OXA-48	1 (3,23 %)	27 (87,09 %)	2 (6,45 %)	1 (3,23 %)



Slika 20. Stupičasti dijagram distribucije enzima po vrstama enterobakterija za 2021. godinu

Tablica 20. Broj i distribucija enzima po vrstama enterobakterija za 2022. godinu

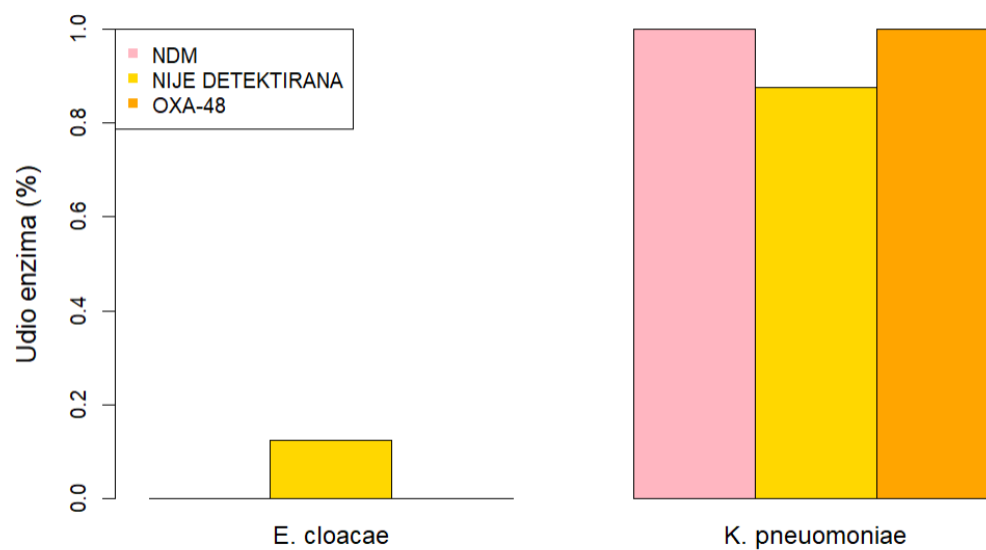
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumon iae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>S. marcescens</i>
KPC	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (100%)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
NDM	2 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (25 %)	0 (0 %)	1 (25 %)	0 (0 %)
NIJE DETEKTI RANA	1 (12,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	7 (87,5%)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
OXA-48	4 (5,26 %)	1 (1,32%)	1 (1,32%)	68 (87,18%)	1 (1,32%)	0 (0 %)	1 (1,32 %)



Slika 21. Stupičasti dijagram distribucije enzima po vrstama enterobakterija za 2022. godinu

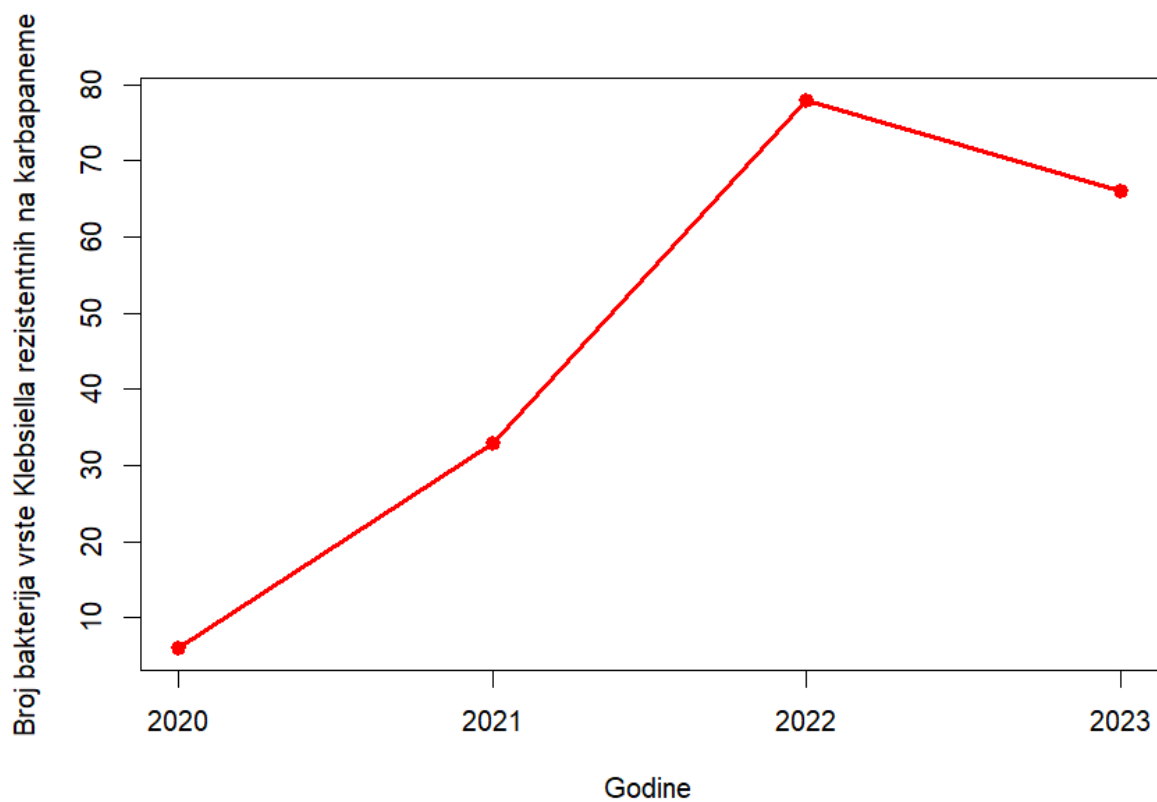
Tablica 21. Distribucija enzima po vrstama enterobakterija za 2023. godinu

	<i>E.cloacae</i>	<i>K.pneumoniae</i>
NDM	0 (0 %)	1 (100 %)
NIJE	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)
DETEKTIRANA		
OXA-48	0 (0 %)	58 (100 %)



Slika 22. Stupičasti dijagram distribucije enzima po vrstama enterobakterija za 2023. godinu

#### 4.6. Trend Klebiselle po godinama



Slika 23. Linijski dijagram - trend *Klebsiella* po godinama

## 5. RASPRAVA

Ovo istraživanje dovodi do spoznaje o porastu broja detektiranih enterobakterija i enterobakterija rezistentnih na karbapeneme. Statistička obrada podataka ukazuje na to da su broj, a samim time i udio detektiranih enterobakterija tijekom promatranog razdoblja u porastu. Od ukupnog broja detektiranih bakterija u navedenom razdoblju udio enterobakterija iznosio je 55,58 % (Tablica 4.). Promatranjem učestalosti rodova enterobakterija za navedeno razdoblje, odnosno za svaku godinu pojedinačno, uočeno je kako su dva najčešće detektirana roda *Klebsiella spp.* i *Escherichia spp.* s time da je zastupljenost *E. coli*, koja najčešće uzrokuje infekcije mokraćnog sustava, bila iznad 50 % svake godine.

Rezistencija kao i sama prevencija rezistencije na karbapeneme postaje sve veći javnozdravstveni problem, a infekcije uzrokovane enterobakterijama povezane su sa značajnim morbiditetom i mortalitetom (15,32). Prvi sporadični izolati rezistentni na karbapeneme u Republici Hrvatskoj detektirani su 2008. godine uz kontinuirani porast detekcije istih što je sukladno i rezultatima ovog istraživanja (33). Tijekom ovog istraživanja, od ukupnog broja izoliranih enterobakterija u 2020. godini 1,13 % bilo je rezistentno na karbapeneme, 2,40 % u 2021., 4,78 % u 2022. te 9,42 % u 2023. godini. Dakle promatranjem i usporedbom udjela karbapenem rezistentnih enterobakterija tijekom trogodišnjeg razdoblja može se zaključiti kako se udio istih povećava.

Većina država koje prati ECDC (Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti), izvijestila je o porastu incidencije *Enterobacterales* koje proizvode karbapenemazu između 2016. i 2020. te su među najčešće detektiranim vrstama bile *K. pneumoniae* i *E. coli* (34). Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (*engl. Centers for disease control and prevention – CDC*) neke od najčešće rezistentnih vrsta pripadaju rodovima *Klebsiella spp.*, *E. coli* te *Enterobacter spp.* (35). Promatrajući rezistentne vrste uočeno je kako su tijekom ovog istraživanja dvije najčešće detektirane rezistentne vrste *K. pneumoniae* te *E. cloacae*, a osim kod ove dvije vrste, rezistencija na karbapeneme također je dokazana i kod *P. stuartii*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. oxytoca* te *P. rettgeri*.

Kao što je navedeno u uvodnom dijelu rada, enterobakterije su razvile nekoliko mehanizama za rezistenciju na karbapeneme, a mehanizam na koji je stavljen naglasak u ovom istraživanju je proizvodnja enzima koji hidroliziraju karbapeneme i samim time onemogućuju djelovanje antibiotika na uzročnika bolesti.

Tri enzima detektirana tijekom ovog istraživanja su KPC, NDM te OXA-48, a kod bakterija kod kojih enzim nije detektiran rezistencija je bila uzrokovana drugim mehanizmom. Nadalje, usporedbom udjela enzima sveukupno po godinama može se zaključiti kako u Hrvatskoj dominira OXA-48 enzim s obzirom da je tijekom trogodišnjeg razdoblja OXA-48 enzim pronađen kod 173 izolata, KPC kod 7 izolata te NDM kod 5 izolata dok kod 22 izolata enzim nije detektiran. Dakle, od ukupno 207 detektiranih enzima u 173 odnosno 83,57% slučajeva radilo se o OXA-48 enzimu. Jedno od provedenih istraživanja je pokazalo kako se NDM enzim najčešće javlja u Indiji, Pakistanu, i na Šri Lanki, a da su enterobakterije koje proizvode KPC najčešće detektirane u Sjedinjenim Američkim Državama, Kolumbiji, Argentini, Grčkoj i Italiji. Bakterije koje proizvode OXA-48 enzim vrlo su često detektirane u Turskoj, Malti, na Bliskom istoku i Sjevernoj Africi (35). Također, nadzorne studije su pokazale da su karbapenemaze slične OXA-48 najčešće karbapenemaze kod *Enterobacterales* u određenim regijama svijeta (21).

U 2020. godini, detektiran je samo OXA-48 enzim te je bio distribuiran među dvije vrste *K. pneumoniae* te *E. cloacae*. U 2021. godini, osim OXA-48 enzima detektiran je i KPC enzim i to jedino kod *K. pneumoniae* dok je OXA-48 distribuiran među četiri vrste: *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii* te *S. marcescens*. Tijekom 2022. godine detektirani su enzimi KPC, NDM i OXA-48 kod ukupno 7 vrsta enterobakterija među kojim su *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* i *S. marcescens*. KPC je detektiran jedino kod *K. pneumoniae*, dok je NDM detektiran kod *E. cloacae*, *K. pneumoniae* te *P. rettgeri*. Kod izolata *P. rettgeri* nije detektirana OXA-48. Također, u 2022. godini identificiran je izolat *E. cloacae* kod kojeg je detektirana prisutnost dva enzima, OXA-48 i NDM što se češće počelo detektirati tijekom i nakon pandemije (36). U 2023. godini enzimi su bili distribuirani među dvije vrste *K. pneumoniae* te *E. cloacae*.

Dakle, iako je u razdoblju od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023. najčešće bila detektirana *E. coli*, najčešće detektiran izolat rezistentan na karbapeneme bio je izolat *K. pneumoniae*. U 2020. godini broj izolata *K. pneumoniae* bio je 6, u 2021. 33 u 2022. 77 te 65 u 2023. godini što ukazuje kako je detektiran trend porasta stopa izolata *K. pneumoniae* otporne na karbapeneme. Prema podacima Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju Hrvatskog lječničkog zbora *K. pneumoniae* dugi niz godina pokazuje visoku stopu rezistencije. *K. pneumoniae* prirodno je otporn na ampicilin, ali je otpornost na ostale beta-laktamske antibiotike stečena zbog dugotrajnog izlaganja antibioticima (37). Pregledom rezultata 35 sličnih istraživanja zaključeno je kako je kolonizacija s *K. pneumoniae* sve veća te ima

promjenjivu distribuciju u različitim zemljopisnim područjima (38). Nadalje, rezultati sličnog istraživanja provedenog u Kini u razdoblju od 2014. do 2017. doveli su do zaključka kako se broj sojeva *K. pneumoniae* u navedenom razdoblju stalno povećavao (39). Također, istraživanjem koje je provedeno u jedinicama za intenzivno liječenje u europskim bolnicama zaključeno je kako je otpornost *K. pneumoniae* problem u srednjoj, istočnoj, južnoj i jugoistočnoj Europi (40).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) proglasila je antimikrobnu rezistenciju kao jednu od deset globalnih prijetnji javnom zdravlju te objavila kako se otpornost *K. pneumoniae* na posljednje sredstvo liječenja, odnosno karbapenemske antibiotike, proširila se na sve regije svijeta. U nekim zemljama karbapenemski antibiotici ne djeluju kod više od polovice pacijenata liječenih od infekcija *K. pneumoniae* (41).

Zaključno, brza dijagnostika uz pomoć genotipskih i fenotipskih metoda detekcije karbapenem rezistentnih enterobakterija vrlo je važna kako bi se što prije otkrio rezistentan mikroorganizam i primjenila odgovarajuća terapija.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ukupan broj rezistentnih i osjetljivih enterobakterija za razdoblje od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023. u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek iznosi 5118 od čega je 206 (4,03 %) rezistentno, a 4909 (95,97 %) osjetljivo na karbapeneme.
- Od ukupnog broja detektiranih bakterija u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek udio enterobakterija u 2020. godini bio je 55,78 %, 57,88 % u 2021., 58,60 % u 2022. i 45,56 % 2023. godini što ukazuje na povećanje broja i udjela detektiranih enterobakterija (Tablica 4.)
- U razdoblju od 18. 5. 2020. do 18. 5. 2023. došlo je do porasta udjela enterobakterija rezistentnih na karbapeneme. Od ukupnog broja izoliranih enterobakterija u 2020. godini 1,13 % bilo je rezistentno na karbapeneme, 2,40 % u 2021., 4,78 % u 2022. te 9,42 % u 2023. godini (Tablica 10.).
- Tijekom razdoblja 18. 5. 2020. - 31. 12. 2020. enzim OXA-48 detektiran je kod dvije bakterijske vrste *K. pneumoniae* i *E. cloacae*, a distribucija je iznosila 62,5 % kod vrste *K. pneumoniae*, a 37,5 % kod vrste *E. cloacae* (Tablica 18.)
- Tijekom razdoblja 1. 1. 2021. - 31. 12. 2021. detektirani su enzimi OXA-48 te KPC. U ovom razdoblju enzimi su detektirani kod četiri vrste enterobakterija: *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii* te *S. marcescens* (Tablica 19.).
- U razdoblju 1. 1. 2022. – 31. 12. 2022. detektirani su enzimi KPC, NDM i OXA-48 kod ukupno 7 vrsta enterobakterija među kojim su *E. cloacae*, *E. coli*., *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* i *S. marcescens* (Tablica 20.).
- Između 1. 1. 2023. i 18. 5. 2023. detektirani su enzimi NDM i OXA-48 samo kod vrste *K. pneumoniae* dok kod *E. cloacae* nije detektiran niti jedan enzim koji uzrokuje rezistencije na karbapeneme što ukazuje da se radi o drugim mehanizmima rezistencije (Tablica 21).
- Brza dijagnostika vrlo je važna kako bi se što prije otkrila rezistencija enterobakterija na karbapeneme te odredila odgovarajuća terapija.



## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Opisati osobitosti detekcije enterobakterija rezistentnih na karbapeneme (KRE) te ispitati učestalost svih enterobakterija, učestalost enterobakterija rezistentnih na karbapeneme, odrediti udio enterobakterija rezistentnih na karbapeneme od ukupno izoliranih enterobakterija i odrediti distribuciju detektiranih karbapenemaza po bakterijskim vrstama.

**Nacrt studije:** Enterobakterije rezistentne na karbapeneme imaju nekoliko mehanizama rezistencije: posjedovanje enzima koji inaktiviraju karabepeneme hidrolizom, stvaranje efluksne pumpe koja izbacuje karbapeneme iz bakterijske stanice te mutacija ili gubitak porina što onemogućuje ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu. Enterobakterije rezistentne na karbapeneme izolirane iz uzoraka posjedovale su enzime OXA-48, KPC, NDM, a bakterijae kod kojih enzimi nisu detektirani rezistenciju su stvorile drugim mehanizmima.

**Ispitanci i metode:** U razdoblju 18. 5. 2020. - 18. 5. 2023. u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek detektirano je i pohranjeno 206 enterobakterija rezistentnih na karbapeneme, a za testiranje rezistencije korišteni su fenotipski i genotipski testovi. Od fenotipskih testova provedeni su: metoda kombiniranih diskova, Lateral Flow test, CARBA NP test, modificirani Hodgeov test te metoda inaktivacije karbapenema (CIM). Genotipski test korišten za testiranje rezistencije na karbapeneme je eazyplex SuperBug CRE.

**Rezultati:** Rezultati pokazuju da se broj detektiranih enterobakterija te broj enterobakterija rezistentnih na karbapeneme tijekom trogodišnjeg razdoblja povećao s obzirom da je od ukupnog broja izoliranih enterobakterija u 2020. godini 1,13 % bilo je rezistentno na karbapeneme, 2,40 % u 2021., 4,78 % u 2022. te 9,42 % u 2023. godini.

**Zaključak:** Istraživanje dovodi do zaključka kako se broj enterobakterija rezistentnih na karbapeneme u promatranom razdoblju povećavao. Rezistencija na karbapeneme najčešće je detektirana kod vrsta *K. pneumoniae* te *E. cloacae* koje osim posjedovanja enzima rezistenciju razvijaju uz pomoć drugih mehanizama.

**Ključne riječi:** enterobakterije, rezistencija, karbapenemi

## 8. SUMMARY

### Methods for detection of carbapenem resistant enterobacteria

**Objectives:** The aim was to describe the characteristics of the detection of carbapenem-resistant enterobacteria (CRE) and to examine the frequency of all enterobacteria, the frequency of carbapenem-resistant enterobacteria, to determine the proportion of carbapenem-resistant enterobacteria from the total number of isolated enterobacteria, and to determine the distribution of detected carbapenemases by bacterial species.

**Study design:** Enterobacteria resistant to carbapenems have several resistance mechanisms, among which are the possession of enzymes that inactivate carbapenems by hydrolysis, the creation of an efflux pump that expels carbapenems from the bacterial cell, and mutation or loss of porins that prevent the entry of antibiotics into the bacterial cell. Enterobacteria resistant to carbapenems isolated from the samples possessed the enzymes OXA-48, KPC, NDM, and in the case of bacteria in which the enzymes were not detected, they created resistance by other mechanisms.

**Participants and methods:** In the period between 18 May 2020 and 18 May 2023, a total of 206 enterobacteria resistant to carbapenems were detected and stored in the Department of Clinical Microbiology and Hospital Infections of the Clinic for Infectology at University Hospital Centre Osijek. Phenotypic and genotypic tests were used to test the resistance of enterobacteria to carbapenems. Among the phenotypic tests, the following were performed: the combined disc method, the Lateral Flow test, the CARBA NP test, the modified Hodge test, and the carbapenem inactivation method (CIM). The genotypic test used for carbapenem resistance testing is the eazyplex SuperBug CRE.

**Results:** The results show that the number of detected enterobacteria, as well as the number of enterobacteria resistant to carbapenems, increased during the three-year period considering that, of the total number of isolated enterobacteria, 1.13 % were resistant to carbapenems in 2020, 2.40 % in 2021, 4.78 % in 2022 and 9.42 % in 2023.

**Conclusion:** The research leads to the conclusion that the number of enterobacteria resistant to carbapenems has been increased in the observed period. Resistance to carbapenems is most often detected in the species *K. pneumoniae* and *E. cloacae*, which, in addition to possessing enzymes, also develop resistance with the help of other mechanisms.

**Key words:** enterobacteria, resistance, carbapenems

## 9. LITERATURA:

1. Carrol KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner T: Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology, 27th edition, New York: Mcgraw-Hill Education; 2016.
2. Kalenić S i suradnici: Medicinska mikrobiologija, drugo, izmjenjeno i obnovljeno izdanje, Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
3. Beader N, Bedenić B, Budimir A, ur. Klinička mikrobiologija odabrana poglavlja. Medicinska naklada, 2019.
4. Mlinarić Galinović G, Ramljak Šešo M i suradnici: Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija, Zagreb: Merkur A.B.D, 2003.
5. Microbiologie clinique, Salmonella-Shigella Agar. Dostupno na <https://microbiologie-clinique.com/ss-agar-salmonella-shigella.html>. Datum pristupa 27.04.2023.
6. Microbiologie clinique, XLD Agar, Principle, Preparation, Interpretation. Dostupno na <https://microbiologie-clinique.com/xld-agar-xylose-lysine-desoxycholate.html>. Datum pristupa 27.04.2023.
7. Microbiologie clinique, MacConkey Agar, Principle, Preparation, Interpretation. Dostupno na adresi: <https://microbiologie-clinique.com/macconkey-agar.html>. Datum pristupa 27.04.2023.
8. Popp J, Bauer M ur, Modern Tehnicques for Pathogen Detection. Wiley-Blackwell, 2015.
9. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36(2):380-407
10. Linčir I, Farmakologija : udžbenik za srednje medicinske i zdravstvene škole, Zagreb : Medicinska naklada, 2012.
11. 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 assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015, 23;10(3)
12. Durante-Mangoni E, Andini R, Zampino R. Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. Clin Microbiol Infect. 2019;25(8):943-950.
13. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, July 2017. Dostupno na adresi

- [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf). Datum pristupa: 02.05.2023.
14. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):303-315.
  15. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018; 25;56(11)
  16. Porreca, A.M., Sullivan, K.V. & Gallagher, J.C. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*, 2018 **20**, 13
  17. Moya C, Maicas S. Antimicrobial Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains: Mechanisms and Outbreaks. *Proceedings*. 2020; 66(1):11.
  18. Makena A, Düzgün AÖ, Brem J, McDonough MA, Rydzik AM, Abboud MI, Saral A, Çiçek AÇ, Sandalli C, Schofield CJ. Comparison of Verona Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 14;60(3)
  19. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019. 30;32(2)
  20. Pongchaikul P, Mongkolsuk P. Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia. *Antibiotics (Basel)*. 2022. 11;11(2)
  21. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Nov 13;33(1)
  22. Dabos L, Oueslati S, Bernabeu S, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. To Be or Not to Be an OXA-48 Carbapenemase. *Microorganisms*. 2022. 24;10(2)
  23. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2015;17:11-21.
  24. Zhou, Qian, et al. Detection of AmpC  $\beta$ -Lactamases in Gram-Negative Bacteria. *Heliyon*, vol. 8, no. 12, 2022. p. e12245
  25. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82
  26. O.K.N.V.I. RESIST-5 In vitro rapid diagnostic test for the detection of OXA-48, KPC, NDM, VIM and IMP carbapenemases in bacterial culture. Dostupno na <https://www.corisbio.com/products/oknvi-resist-5>. Datum pristupa 15.05.2023.

27. Rapidec® CARBA NP Rapid, reliable test for Carbapenem-producing bacteria. Dostupno na adresi: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/rapidec-carba-np>. Datum pristupa 15.05.2023.
28. Kansak N, Çalık Ş, Arıcı N, Adaleti R, Aksaray S, Gönüllü N. Performance of the Rapidec®Carba NP assay for the detection of different carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. *Indian J Med Microbiol.* 2022;40(4):516-520.
29. Cordovana M, Pranada AB, Ambretti S, Kostrzewa M. MALDI-TOF bacterial subtyping to detect antibiotic resistance. *Clin Mass Spectrom.* 2019;14;14 Pt A:3-8.
30. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(5):1219-33.
31. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, Ruppelt A, Makarewicz O, Pletz M, Reißig A, Slickers P, Ehricht R. Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One.* 2014; 28;9(7)
32. Latania K. Logan , Robert A. Weinstein, The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 215, 2017,215(suppl\_1):S28-S36
33. Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A, Zujčić 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-Andrašević A. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol.* 2018;67(8):1031-1041
34. Hobson CA, Pierrat G, Tenailon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, Jacquier H, Birgy A. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022, 20;66(9)
35. Tilahun M, Kassa Y, Gedefie A, Ashagire M. Emerging Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infection, Its Epidemiology and Novel Treatment Options: A Review. *Infect Drug Resist.* 2021
36. Bedenić B, Luxner J, Car H, Sardelić S, Bogdan M, Varda-Brkić D, Šuto S, Grisold A, Bader N, Zarfel G. Emergence and Spread of Enterobacterales with Multiple Carbapenemases after COVID-19 Pandemic. *Pathogens.* 2023,3;12(5):677
37. Tambić Andrašević A, Žmak Lj, Obrovac M, Payerl Pal M, Debelec D et al, Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021.g., 2021, Zagreb

38. Tesfa T, Mitiku H, Edae M, Assefa N. Prevalence and incidence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* colonization: systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2022,15;11(1):240
39. Yang X, Sun Q, Li J, Jiang Y, Li Y, Lin J, Chen K, Chan EW, Zhang R, Chen S. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. *Emerg Microbes Infect.* 2022 Dec;11(1):841-849
40. Vogelaers D, Blot S, Van den Berge A, Montravers P; Abdominal Sepsis Study ('AbSeS') Group on behalf of the Trials Group of the European Society of Intensive Care Medicine. Antimicrobial Lessons From a Large Observational Cohort on Intra-abdominal Infections in Intensive Care Units. *Drugs.* 2021,81(9):1065-1078
41. World Health Organization, Antimicrobial resistance, 2021. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Datum pristupa: 31.08.2023.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

- Ime i prezime: Sara Glavaš
- Datum i mjesto rođenja: 15.09.1998., Đakovo
- Adresa stanovanja: Stanka Vraza 6, Đakovo
- Kontakt: +385 99 408 1152
- E-mail: sara.glavas5@gmail.com

### Obrazovanje

- 2005.-2013. Osnovna škola Vladimira Nazora, Đakovo
- 2013.-2017. Opća gimnazija Antuna Gustava Matoša, Đakovo
- 2018.-2021. Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Zdravstveno veleučilište Zagreb
- 2021.-2023. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek