Antibakterijska aktivnost 5-nitro-8-hydroxyquinolina protiv multirezistentih gram-negativnih bakterija

Stojačić, Vlatka

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:446321

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Vlatka Stojačić

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST 5-NITRO-8-HYDROXYQUINOLINA PROTIV MULTIREZISTENTNIH GRAM-NEGATIVNIH BAKTERIJA

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Vlatka Stojačić

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST 5-NITRO-8-HYDROXYQUINOLINA PROTIV MULTIREZISTENTNIH GRAM-NEGATIVNIH BAKTERIJA

Završni rad

Osijek, 2018.

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević na nesebičnoj pomoći, ustupljenom znanju i podršci tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem dr. med. Maji Bogdan i dr. med. Marijanu Orloviću na korisnim savjetima, razumijevanju i strpljenju tijekom istraživanja i izrade rada.

Posebno zahvaljujem mojim roditeljima, obitelji, dečku i prijateljima koji su vjerovali u mene i pružali mi razumijevanje, bezuvjetnu podršku i ljubav.

Rad je ostvaren u Medicinskom fakultetu u Osijeku na Katedri za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko laboratorijsku dijagnostiku i Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

Mentor rada je izv. prof. dr. sc. Domagoj Drenjančević, dr. med. spec. med. mikrobiologije s parazitologijom.

Rad ima 27 radna lista, 3 tablice i 12 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Antibiotici i antibiotska rezistencija 1

1.2. Nitroxolin (5-nitro-8-hydroxyquinolin) 2

1.3. Multirezistentne gram-negativne bakterije iz grupe ESCAPE 4

1.3.1. *Klebsiella pneumonia* 4

1.3.2. *Escherichia coli* 5

1.3.3. *Pseudomonas aeruginosa* 6

2. CILJ RADA 8

3. MATERIJALI I METODE RADA 9

3.1. Ustroj studije 9

3.2. Kulture mikroorganizama 9

3.3. Izrada antibiograma - disk difuzijska metoda određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike 9

3.4. Očitavanje zone inhibicije 12

3.5. Statističke metode 15

4. REZULTATI 16

5. RASPRAVA 19

6. ZAKLJUČAK 21

7. SAŽETAK 22

8. SUMMARY 23

9. LITERATURA 24

10. ŽIVOTOPIS 27

1. UVOD

Jedno je od najvažnijih otkrića moderne medicine otkriće antibiotika, no tijekom godina bakterije su se prilagođavale uvjetima okoliša u kojemu je uporaba antibiotika postajala sve raširenija i s vremenom su i gram-pozitivne i gram-negativne bakterije razvile rezistenciju. Ovaj tijek događaja predstavlja rastući i uznemirujući problem za globalno javno zdravstvo (1).

1.1 Antibiotici i antibiotska rezistencija

Antibiotici su antibakterijski lijekovi selektivne toksičnosti: netoksični za organizam čovjeka, ali toksični za bakterije. Ove lijekove dijelimo na prirodne (proizvodi nekih gljiva i bakterija) i sintetičke. Djelovanje antibiotika primjenjujemo na zaustavljanje rasta i razmnožavanja bakterija (bakteriostatsko djelovanje) i na „ubijanje" bakterije, tzv. baktericidno djelovanje. Općenito, antibiotici mogu djelovati na razne procese u bakterijskoj stanici: na bakterijsku staničnu stijenku, na sintezu prekursora peptidoglikana ili formiranje peptidoglikanskog sloja, a s obzirom da ljudske stanice ne posjeduju peptidoglikan, može se postići velika selektivna toksičnost; na citoplazmatsku opnu ometajući funkcionalnost membrane; sprječavanjem sinteze proteina na ribosomima te sprječavanjem sinteze nukleinskih kiselina. Osjetljivost bakterije na antibiotik okarakterizirana je izrađivanjem testa osjetljivosti ili antibiograma, uz definiciju minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije. Osjetljivost je opisana djelovanjem antibiotika na bakterijski soj uz stvaranje područja bez bakterijskoga rasta uz prisutnost antibiotika. Antibiotska rezistencija, poteškoće provođenja terapije i liječenja bakterijskih infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama predstavlja jedan od najvažnijih kliničkih, epidemioloških i mikrobioloških problema današnjice. Rezistencija bakterija na antibiotike karakterizira koncentracije antibiotika koje se mogu postići u ljudskom organizmu, a da ne djeluju na bakteriju. Rezistencija može biti primarna (intrinzična, urođena) i sekundarna (stečena). Intrinzična je rezistencija kada bakterija nema ciljno mjesto djelovanja antibiotika te takva rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika, prema tome razlikujemo antibiotike širokoga i uskoga spektra. Stečena je rezistencija posljedica procesa prirodnih mutacija genoma bakterija, slučajnog nastanka gena rezistencije ili horizontalnog širenja gena rezistencije. Razlikujemo mehanizme sekundarne rezistencije: produkcija enzima koji modificiraju ili razgrađuju antibiotik,

smanjena propusnost stanične stijenke, pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice i promjena ciljnog mjesta djelovanja, ali i stvaranje biofilma. Antibiotska je rezistencija izrazito problematična u okviru nozokomijalnih infekcija uzrokovanim gram-negativnim bakterijama, vezana uz uporabu katetera, respiratora, instrumenata pri kirurškim zahvatima, ali i pretjeranom uporabom i prepisivanjem antibiotika, neodgovarajućom uporabom i nestandardnim lijekovima (1,2).

1.2. Nitroxolin (5-nitro-8-hydroxyquinolin)

Nitroxolin (molekularna forma $C_9H_6N_2O_3$) je antibakterijski lijek koji aktivno djeluje na osjetljive gram-pozitivne i gram-negativne bakterije koje uzrokuju infekcije urinarnog trakta. Osim antibakterijskog djelovanja posjeduje i antifugalno te se smatra da ovaj lijek ima i antitumorsko djelovanje inhibicijom proteina metionina aminopeptidaze koji je uključen u angiogenezu. Koristio se od 1962. godine u liječenju urinarnih infekcija, osobito onih uzrokovanih gram-negativnim bacilima poput *E. coli*. Iako je godinama poznat, posebno u Njemačkoj, nije primjenjivan u drugim zemljama te je očekivano da će rezistencija biti manje zastupljena. Ono, što je ponovno zaintrigiralo stručnu javnost, aktivnost je nitroxolina na gljive, *Mycoplasmu* i *Ureaplasmu urealyticum* te *Trichomonas* (3).

Nitroxolin se može rabiti kao terapija i profilaksa za nekomplicirane urinarne infekcije jer ima antiadherentno djelovanje na tkivo mjehura te dovodi do deficita bakterijskih pila stvaranjem kelatnih kompleksa. Stvaranjem kelatnih kompleksa s magnezijem, akumuliraju se i dovode do poremećaja metabolizma proteina i energije bakterijske stanice (4). Češće se primjenjuje u populaciji izvanbolničkih infekcija te nije dovoljno poznat njegov učinak na rezistentne bakterije osobito onih sojeva koji cirkuliraju na područjima gdje nije postojao selekcijski pritisak njegove primjene.

Na području Njemačke, nitroxolin je licencirani antibiotik u liječenju akutnih urinarnih infekcija i profilaksa rekuretnih infekcija. Istraživanjem *in vitro* metodom, difuzijskom metodom na agaru, pokazalo se da nitroxolin djeluje na veliki broj uropatogenih bakterija i to posebno protiv sojeva *E.coli*. Smatra se da je mehanizam djelovanja nitroxolina kelacija dva dvovalenta kationa bakterijske RNA polimeraze koji dovode do bakteriostatične aktivnosti u većini slučajeva. Standardna je doza, koja se primjenjuje, 250 mg svakih 8 sati. Metabolizira se u konjugirane i nekonjugirane metabolite koji se većinom izlučuju urinom.

Pri subinhibitornim koncetracijama, antibiotik inhibira adheziju uropatogene *E. coli* na uroepitelne stanice i urinarne katetere. Iako je prisutan na njemačkom tržištu desetljećima, rezistencija na nitroxolin pronalazi se vrlo rijetko (5).

Wagenlegner i suradnici proveli su istraživanje o antibakterijskoj aktivnosti 250 mg nitroxolina prema 200 mg trimetoprima protiv uropatogena u zdravih volontera te su uglavnom pokazali bakteriostatično djelovanje nitroxolina u urinu. Kroz daljnje istraživanje pokazano je da se nitroxolin može preporučiti kao lijek u nekompliciranom cistitisu. Nitroxolin je pokazao veću baktericidnost u kiselijim urinima (6).

Otkako je otkriveno da kationi reguliraju stvaranje biofilma, istraženo je da je sinteza biofilma bila reducirana za više od 80% na minimalnoj inhibicijskoj koncentraciji u *P. aeruginosa* korištenjem nitroxolina (4). Biofilm je opisan kao sesilna zajednica mikroorganizama, višestanična struktura koja štiti bakteriju od vanjskih utjecaja, također stvara i rezistenciju na antibiotike te tako omogućava perzistenciju bakterijama na područjima u kojima bakterija ne bi trebalo biti (7, 8). Samo je stvaranje biofilma još uvijek jedna od brojnih tema istraživanja s obzirom na opseg problema koji stvara u zdravstvu. Ono, što ga čini problematičnim, otpornost je na dezificijense pa ga je nemoguće ukloniti s površina, također ukoliko ga bakterije posjeduju, mogu se raširiti u okolna tkiva i cirkulaciju, dovodeći tako do nastanka brojnih akutnih bolesti u organizmu (9).

In vitro istraživanje efikasnosti nitroxolina (10) pokazalo je kako nitroxolin obuhvaća široki spektar antimikrobnog djelovanja s inhibicijskom zonom i minimalnim inhibitornim koncentracijama znatno ispod EUCAST raspodjele za *E.coli* kod većine organizama i tako uputilo da bi se mogao iskoristiti kao terapija u nekompliciranim urinarnim infekcijama.

1.3. Multirezistentne gram-negativne bakterije iz grupe ESCAPE

Multirezistentnim gram-negativnim bakterijama iz ESCAPE grupe pripadaju vrste *K. pneumonia, E. coli* i *P. aeruginosa*. Naziv je ove skupine akronim nastao od imena multirezistentnih bakterija: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacteriaceae* (13). Ove su bakterije prepoznate kao vodeći svjetski uzročnici multirezistentnih bakterijskih infekcija. Tri bakterije od interesa često uzrokuju infekcije mokraćnih puteva, osobito u nozokomijalnih pacijenata iako je sve raširenija pojavnost izvanbolničkih infekcija ovim patogenima. Nozokomijalne infekcije mogu biti endogene ili egzogene i prenesene su direktno ili indirektno kontaktom između pacijenata, zdravstvenih radnika, kontaminiranih objekata, osoba u posjetu ili raznim okolišnim čimbenicima. ESBL producirajuće *E.coli* i *Klebsiella* sp. bilježe porast u frekvenciji i jačini. Neka od novijih istraživanja pokazala su neovisan prediktor mortaliteta, prolongirano zadržavanje u cirkulaciji, odgađanje djelovanja odgovarajuće antimikrobne terapije te povećanje bolničkih troškova (14,15).

Urinarne su infekcije heterogena skupina bolesti i kliničkih sindroma. Klasifikacija infekcija urinarnog trakta iznimno je složena i razlikuje se po epidemiologiji, etiologiji, lokalizaciji, težini, simptomima, recidiviranju, pojavi komplikacija, dijagnozi, antimikrobnom liječenju i ishodu. Bakterije su najčešći uzročnici infekcija urinarnog sustava. Normalno su one dio crijevne flore koja je kontaminirala mokraćni trakt. Često zahvaća upravo mokraćni mjehur te se kao posljedica javlja cistitis. Žene su izloženije bakterijskom cistitisu nasuprot muškarcima uslijed kratkoće uretre pa se infekcija može lakše proširiti iz područja perineuma. Najčešći uzročnici su *E. coli, Proteus, Klebsiella* i *Enterobacter* (11,12,13).

1.3.1 *Klebsiella pnemonia*

Rod *Klebsiella* pripada oportunističkim enterobakterijama iako postoje i kao komenzali i primarni patogeni. Pripada gram-negativnim bakterijama. Značajka roda *Klebsiella* u posjedovanju je dobro razvijene kapsule, njenog čimbenika virulencije. Ove su bakterije nepokretne, jednostavnih zahtjeva za rast, jednostavno se izoliraju iz kliničkih uzoraka te posjeduju endotoksin. Vrsta *Klebsiella pneumoniae* ima tri podvrste *K. pneumoniae* subsp.

pneumoniae, *K. pneumoniae* subsp. *ozenae* i *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis.* Najčešće u humanim infekcijama pronalazimo *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* koja se praktično naziva samo *K. pneumoniae*.

Ukoliko je primarni patogen, uzrokuje nekrotizirajuću pneumoniju (alkoholičari) i infekcije urinarnog sustava. Možemo ju pronaći kao komenzala probavnog sustava ljudi, ali i u prirodi. Oportunističke infekcije uzrokuje u slučajevima oslabljene imunosti čovjeka uslijed neke druge bolesti te su infekcije većinom povezane sa zdravstvenom skrbi (postoperativne infekcije, sepsa i meningitis u novorođenčadi). U nozokomijalnim uvjetima *K. pneumoniae* se može prevenirati pravilnom higijenom ruku, primjenom antisepse i asepse u radu s pacijentima. Poznato je da je *K. pneumoniae* prirodno rezistentna na ampicilin. S obzirom da su njezini nozokomijalni sojevi stekli otpornost na β-laktamske antibiotike i aminoglikozide, pri liječenju infekcija uvijek je potrebno izraditi test osjetljivosti na antibiotike (1, 16).

1.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli pripada rodu *Escherichia* te je dio normalne flore crijeva, no može biti povezana s infekcijom bilo kojeg organa i tkiva. Njezina je fiziologija i struktura tipična za enterobakterije: gram-negativni štapić. Većina ih je pokretna, neki sojevi imaju fimbrije, a neki jasno razvijenu kapsulu. Metabolizira laktozu. Osjetljiva je na dezificijense, a lako se razmnožava u hrani te ju pronalazimo u vodi, tlu i na različitim predmetima biološkog materijala. (1)

U okviru urinarnih infekcija *E. coli* se naziva uropatogenom *E. coli* (UPEC) koja uzrokuje gotovo 90% urinarnih infekcija kod osoba bez funkcionalnih i anatomskih oštećenja urinarnog sustava, tzv. nekompliciranе infekcije urinarnog trakta. Sojevi uropatogene *E.coli* normalna su flora kolona, perineja, donjih dijelova uretre, no mogu migrirati do mokraćnoga mjehura, uretre i pijelona te čak i prostate i uzrokovati infekciju. Kod žena je raširenija pojava infekcije *E. coli* uslijed kratkoće uretre i blizine analnog otvora. *E. coli* pripada grupi ESBL izolatima, odnosno onima kod kojih se pojavljuje rezistencija zbog produkcije β-laktamaza proširenog spektra(extended spectrum β-lactamase) (1, 17, 18).

1.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je asporogeni, aerobni gram-negativni štapić. Neki sojevi posjeduju polisaharidnu kapsulu. Karakterizira je miris lipe, opisan kao slatkast i voćan. Pseudomonas posjeduje citokrom-oksidazu, katalazu i oksidazu koja ga razlikuje od enterobakterija. Laktoza je negativna bakterija što ju također razlikuje od enterobakterija te nonfermentor u reakciji na Kliglerovom agaru. Dehidrolizira arginin, koristi citrat i raste pri 42°C. Striktnog su respiratornog sustava s kisikom koji im je terminalni akceptor elektrona. Pokretne su bakterije s jednim ili više bičeva, široko rasprostranjene u prirodi, tlu, vodi, biljkama, životinjama s velikom predilekcijom vlažnom okolišu. Razni metaboličkim putevima koristi se jednostavnim i složenim ugljikohidratima, alkoholom, aminokiselinama (izvor ugljika) te utilizira otopljene plinovite supstrate u destiliranoj vodi i tako se razmnožava. Većina ih je mezofilna s optimalnom temperaturom rasta i razvoja pri 30°C i 37°C. Jedna je od karakteristika stvaranje vodotopljivih pigmenata (1).

Infekcije, koje *P. aeruginosa* uzrokuje, primarno su oportunističke u bolesnika s oslabljenom imunošću jer *Pseudomonas* izmiče obrambenim mehanizmima i ima sposobnost izazivanja raznih bolesti. Uzrokuje infekciju kolonizacijom kože i sluznica, adherencijom pomoću flagela, potom invadira tkiva i organe te dovodi do diseminarnih bolesti i sepse. Čimbenici patogenosti strukturni su (flagele, pili, fimbrije) i sekrecijski (tri tipa sekrecijskih sustava), no glavni je čimbenik patogenosti lipopolisaharid vanjske membrane (endotoksin) i egzotoksin A koji je produkt kliničkih izolata, a djeluje inhibirajući sintezu proteina i rezultat je stanična smrt. Uzrokuje široki spektar infekcija, no one su najčešće udružene sa zdravstvenom skrbi, hospitalizacijom (dužom od tjedan dana), kompromitiranom imunošću pacijenta (AIDS, maligne bolesti, cistična fibroza) te mogu završiti smrtnim ishodom. Pronaći ju možemo i u ovlaživačima zraka, umivaonicama, kadama, hidroterapijskim bazenima, sanitarnim odvodima, u bolnicama na kremama, dezificijensima, sapunima, tekućinama za ispiranje, opremi za dijalizu, respiratorima.

U infekcijama mokraćnog sustava udružena je s kateterizacijom (npr. gdje stvara biofilm na unutrašnjim stijenkama katetera) što može dovesti do kroničnih infekcija kod takvih pacijenata instrumentalizacijom te kirurškim zahvatima i opstrukcijom urinarnog sustava. *P. aeruginosa* producira enzime rezistencije ESBL spektra, karbapenemaze, stoga

pronalazimo rezistenciju na karbapeneme, antibiotike β-laktamskog spektra djelovanja iako stječe i rezistenciju genskim mutacijama u mehanizmima slabe propusnosti stanične stijenke (intrizična rezistencija), promjenom ciljnog mjesta djelovanja, aktivnim efluksnim mehanizmom i stvaranjem staničnih kromosomalnih i plazmidnih β-laktamaza, cefalosporinaza i aminoglikozidaza (1, 19, 20).

2. CILJEVI RADA

Ciljevi su ovog istraživanja testirati:

1. osjetljivost kliničkih izolata multirezistentnih bakterija *E. coli* ESBL soj, *Klebsiella pneumonia* ESBL soj i *Pseudomonas aeruginosa* na 5-nitro-8-hydroxyquinolin disk difuzijskom metodom

2. interpretirati rezultate testiranja osjetljivosti i očitati antibiogram

3. usporediti osjetljivost između bakterijskih vrsta.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1 Ustroj studije

Ova je studija temeljno fundamentalno in vitro presječno istraživanje.

3.2 Kulture mikroorganizama

Istraživanje je napravljeno na ukupno 50 izabranih uzoraka gram-negativnih izolata tri bakterijske vrste, od kojih je 23 (46 %) *Escherichia coli*, 12 (24 %) uzoraka je *Klebsiella pneumoniae*, a 15 (30 %) uzoraka je *Pseudomonas aeruginosa*, dobivenih iz kliničkih uzoraka urina iz rutine i iz zbirke bakterijskih sojeva Katedre za mikrobiologiju, parazitologiju i kliničko laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Istraživanje je obavljeno tijekom srpnja i kolovoza 2018. godine u laboratoriju za dijagnostiku urinarnih infekcija Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

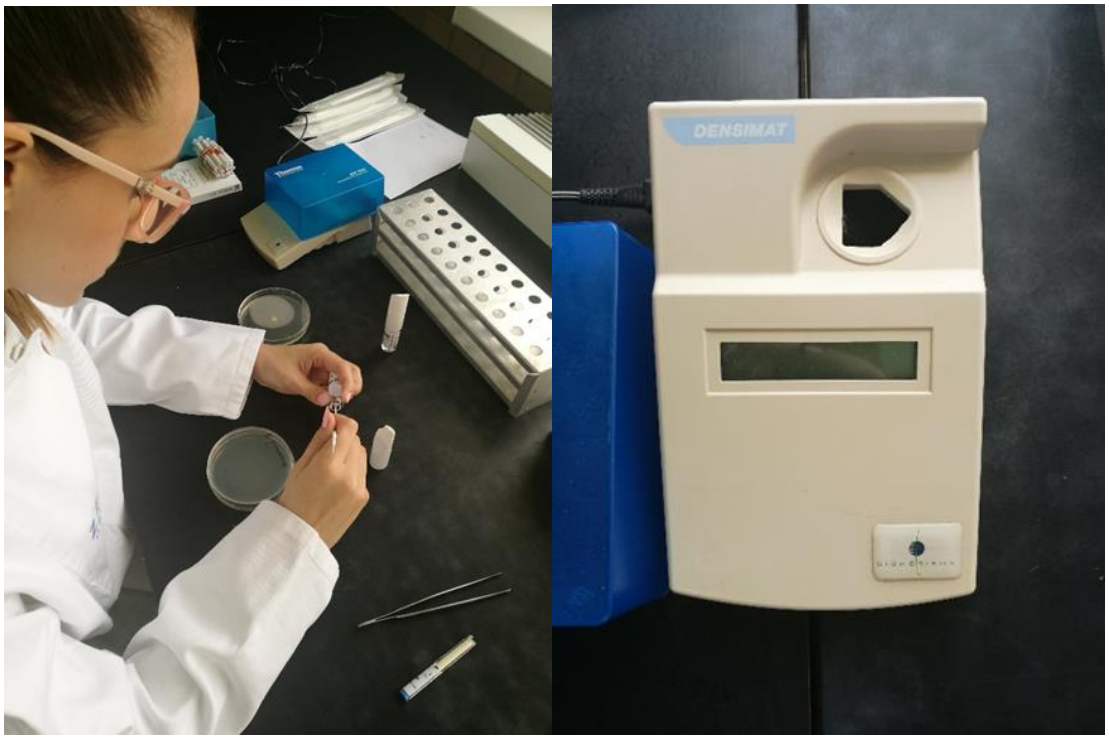
3.3 Izrada antibiograma – disk difuzijska metoda određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike

Nakon što su sterilni agari u Petrijevim zdjelicama označeni nazivima bakterija *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa,* sterilnom je ezom uzorkovan dio svake pojedinačne kolonije kulture bakterija koje su potom inokulirane na krvni agar tako što su razmazane u 3 smjera, svaki put ostavljajući negativnu kontrolu.

Nakon inkubacije u termostatu tijekom 24 sata na 37°C, sa svakog ispitivanog uzorka uzela se mala količina bakterijskoga soja sterilnom ezom te se na stijenci bočice fiziološke otopine učinila suspenzija bakterija optičke gustoće 0,5 McFarlanda ($1{,}5x10^8$ cfu/ml), strojno izmjerena na turbidimetru (Densimat, BioMérieux, Francuska). Ukoliko je bilo

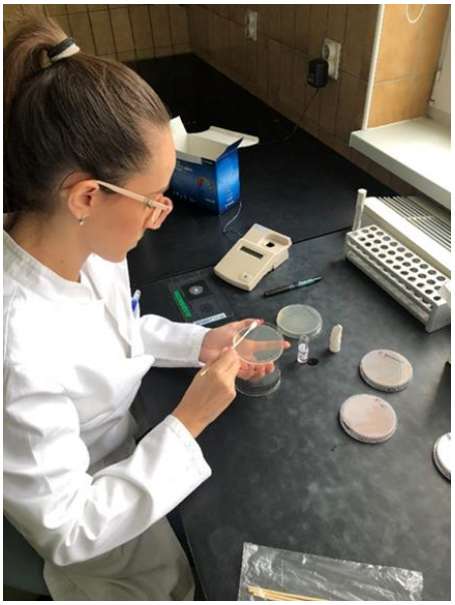
potrebno, ponavljao se postupak inokulacije i mjerenja do postignuća zahtijevane optičke gustoće.

a) b)



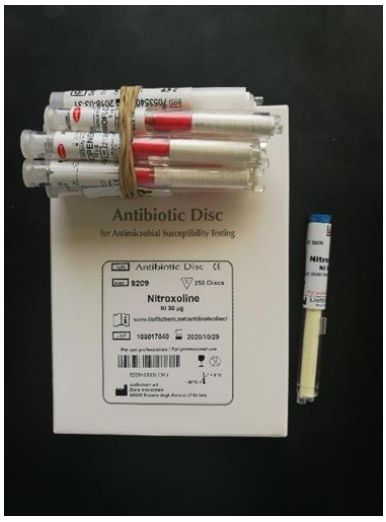
Slika 1. a) Izrada suspenzije zahtijevane optičke gustoće, b) Turbidimetar za mjerenje optičke gustoće medija (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

Sterilnim brisom ocijeđenim o stijenke bočice, svaka je suspenzija nanesena preko cijele ploče Mueller Hinton agara u tri smjera, a svaki prijelaz razmazivanja pomiče se za 60°.



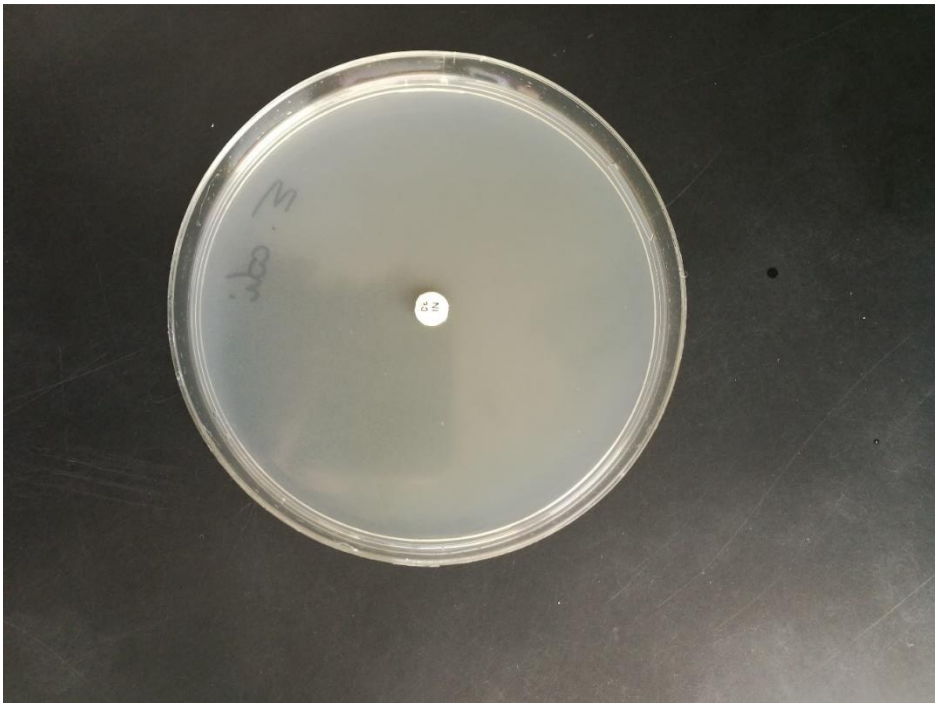
Slika 2. Nanošenje suspenzije na Mueller Hinton agar (fotografirala dr. Maja Bogdan, ZZJZ Osječko-baranjske županije, Medicinski fakultet Osijek)

Po završetku nanošenja medija na agar, iz stupca antibiotika pincetom, koja je prethodno sterilizirana plamenom, izvadi se disk antibiotika, prenese na sredinu agara te se lagano utisne. U nanošenju antibiotika, primjenjujemo pravilo 15 minuta, odnosno, 15 minuta potrebno je ostaviti da se bakterijski soj upije na podlogu i potom staviti disk antibiotika.



Slika 3. Stupci antibiotika nitroxolina (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

Naposljetku, agar se inkubirao aerobno 18-24h na 37°C u inkubatoru (Binder GmbH, Tuttlingen, Njemačka).



Slika 4. Svježe pripremljeni antibiogram (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

3.4 Očitavanje zone inhibicije

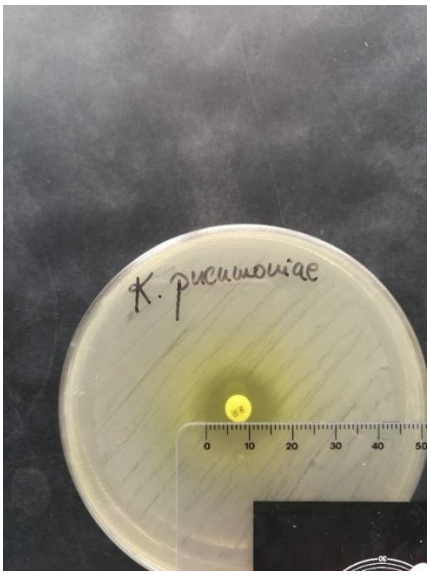
Nakon obavljene inkubacije, testiranje osjetljivosti ovih kliničkih izolata obavit će se disk difuzijskom metodom, standardnom metodom rutinskog testiranja osjetljivosti na antibiotike u kliničkom mikrobiološkom laboratoriju. U testiranju se koristi Mueller-Hintonov agar kalibriran prema EUCAST standardu (European Committee on Antimicrobal Susceptibility Testing). Metoda je semikvantitativna.

Zona inhibicije mjeri se ravnalom u milimetrima, a pojavljuje se ukoliko antibiotik ima aktivnost prema testiranom izolatu te nema uzgoja kolonija oko diska antibiotika. Ukoliko ima rasta bakterijskog izolata oko antibiotika, u ovisnosti o izmjerenoj zoni inhibicije sukladno veličini zone, interpretacijom se razvrstava u tri kategorije: senzitivan (S), intermedijarno senzitivan (I) i rezistentan (R). Veličina zona uspoređuje se sa standardnim zonama inhibicije koje koreliraju s minimalnim inihibitornim koncentracijama koje antibiotik postiže na mjestu djelovanja *in vivo* i dio su EUCAST standarda (21) za rutinsko

testiranje osjetljivosti bakterija na antibiotike. U tablici 1. prikazane su zone inhibicije prema kojima je određeno jesu li testirani bakterijski sojevi rezistentni ili osjetljivi na nitroxolin. Korištene su zone inhibicije za rod *Enterobacteriaceae,* vrste *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, ali i za *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas* spp.) koja još uvijek nema definirane zone inhibicije za nitroxolin prema EUCAST standardima (22).

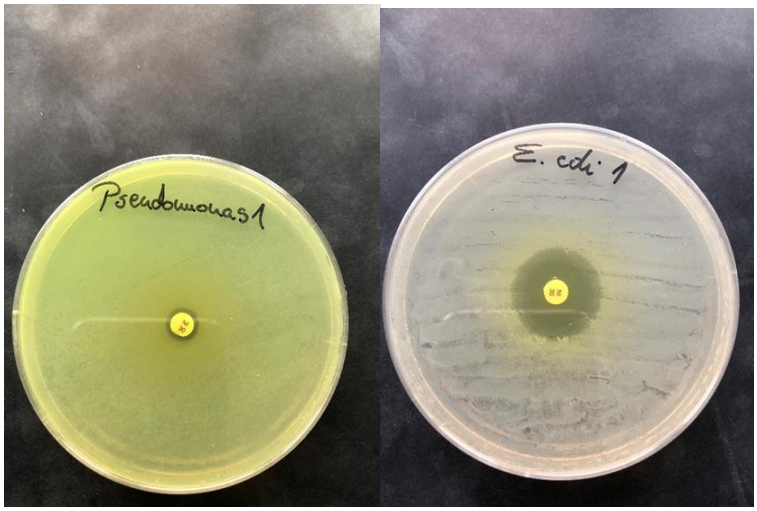
Tablica 1. Zone inhibicije ispitivanih vrsta

Svojstvo djelovanja nitroxolina	Zona inhibicije u milimetrima (mm)
Rezistentnost	<15
Osjetljivost	>15

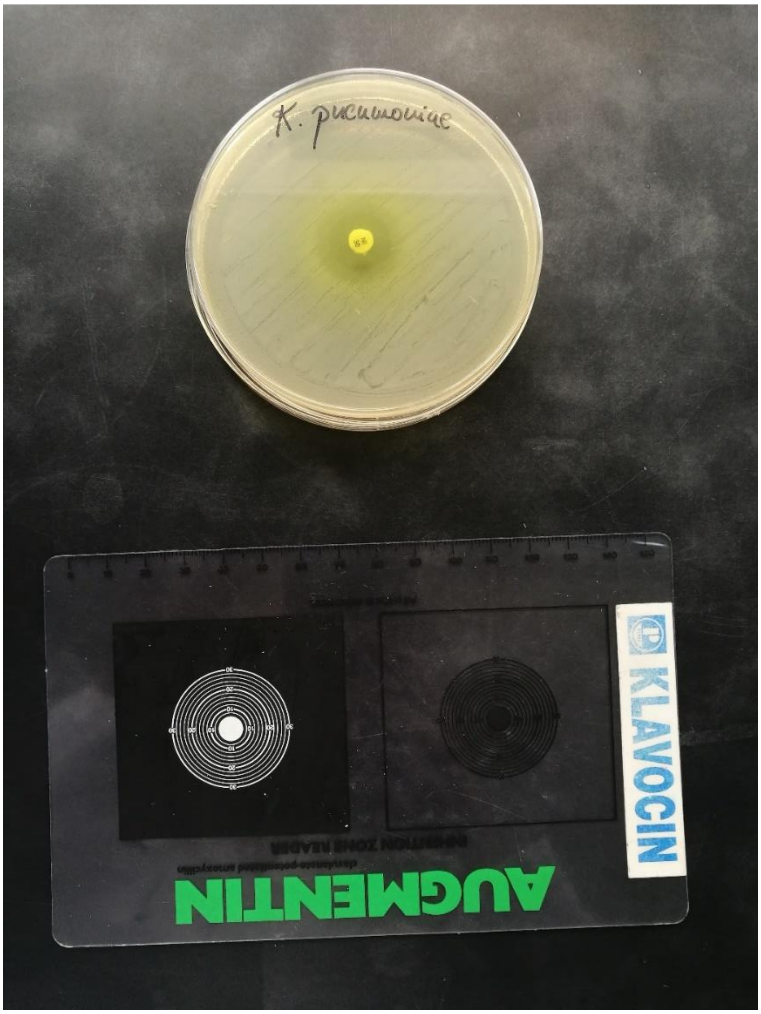


Slika 5. Mjerenje zone inhibicije *Klebsiella pnemoniae* (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

a) b)



Slika 6. a) Antibiogram *Pseudomonas aeruginosa*, b) Antibiogram *Escherichia coli*. (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)



Slika 7. Ravnalo za očitavanje zone inhibicije na antibiogramu *K. pnemoniae* (fotografirala Vlatka Stojačić, Medicinski fakultet Osijek)

3.5. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim frekvencijama. Numerički su podatci opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između tri skupine testirane su Kruskal Wallisovim testom. Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na Alpha=0,05. Za statističku analizu koristio se statistički program MedCalc Statistical Software version 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2018).

4. REZULTATI

Istraživanje je napravljeno na ukupno 50 izabranih uzoraka gram-negativnih izolata tri bakterijske vrste, od kojih je 23 (46 %) *Escherichia coli*, 12 (24 %) uzoraka *Klebsiella pneumoniae* i 15 (30 %) uzoraka *Pseudomonas aeruginosa*.

Očitavanjem zona inhibicije, rezultate se očitavalo prema EUCAST standardima (European Committee on Antimicrobal Susceptibility Testing) u kojima je djelovanje nitroxolina na enterobakterije opisano na sljedeći način: osjetljivo (S) veće od 15 mm zone inhibicije (>15 mm) dok je rezistentno (R) pri manje od 15 mm zone inhibicije (<15 mm).

Značajno veću zonu inhibicije (koju iskazujemo u milimetrima) disk nitroxolina na antibiogramu ima u slučaju *E. coli* ESBL, središnje vrijednosti (medijan) 20 mm (interkvartilnog raspona od 18 mm do 23 mm), a značajno najmanju pronalazimo kod *P. aeruginosa* medijana 7 mm (interkvartilnog raspona od 6 mm do 8 mm) (Kruskal Wallis test, $P < 0,001$) (Tablica 2).

Tablica 2. Vrijednosti zone inhibicije (mm).

	Medijan (interkvartilni raspon) zone nitroxolina	Minimum – maksimum	P*
E. coli ESBL (mm)	20 (18 – 23)	14 – 26	**< 0,001**
K. pneumoniae EBSL (mm)	17 (10,5 – 18,75)	6 – 22	
P. aeruginosa (mm)	7 (6 – 8)	6 – 17	

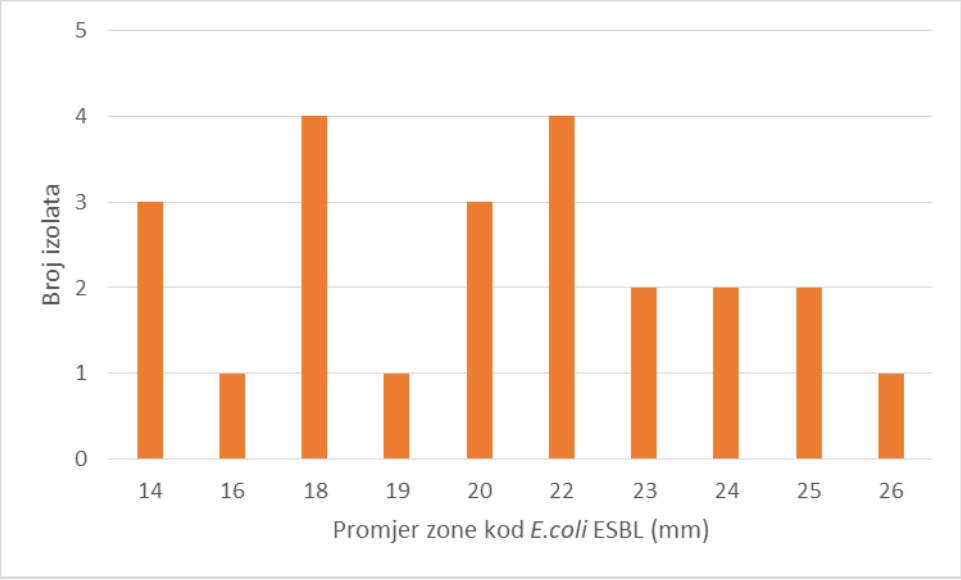
*Kruskal Wallis test

Ukupno je 29 (58 %) osjetljivih uzoraka od kojih je značajno više 20 (87 %) na *E. coli* dok su rezistentni uzorci značajno češći kod *P. aeruginosa*, no treba obratiti pozornost da su korišteni podaci EUCAST standarda za enterobakterije u ovome radu u nedostatku standarda za nitroxolin i *Pseudomonas* spp. (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) (Tablica 3).

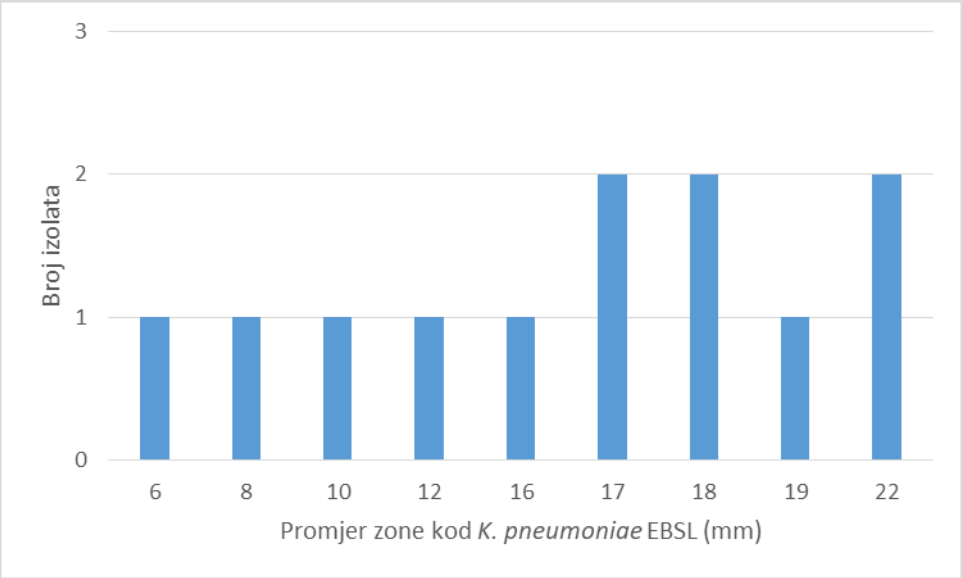
Tablica 3. Raspodjela prema vrsti uzoraka i uzročniku u odnosu na primjenu nitroxolina.

S obzirom na nitoxolin	Broj (%) uzoraka				
	E. coli ESBL	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	Ukupno	P*
Osjetljivi uzorci	20 (87)	8 / 12	1 / 15	29 (58)	
Rezistentni uzorci	3 (13)	4 / 12	14 / 15	21 (42)	< **0,001**
Ukupno	23 (100)	12 / 12	15 / 15	50 (100)	

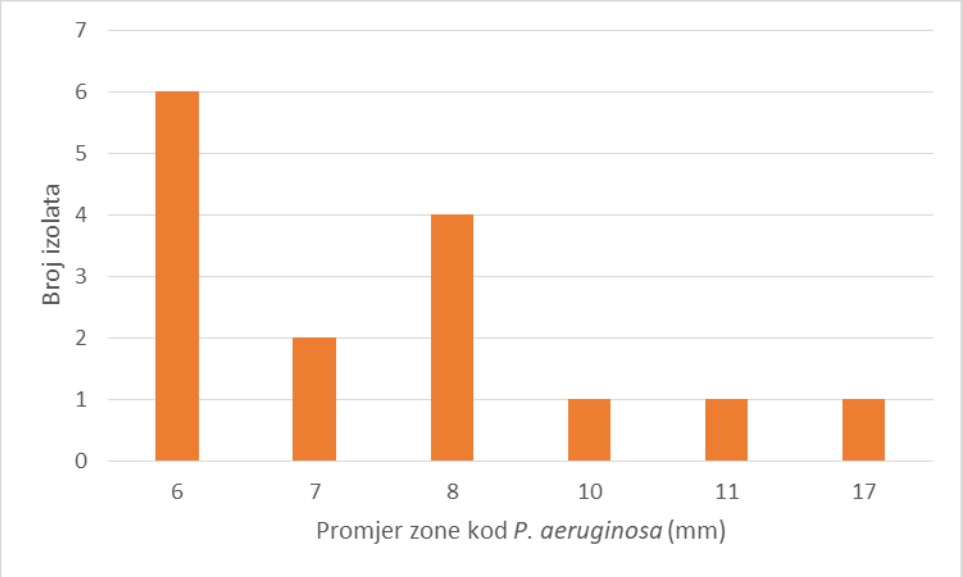
*Hi-kvadrat test



Slika 8. Distribucija inhibicijskih zona *E. coli* (N=23) testiranih na nitroxolin disk difuzijskom metodom



Slika 9. Distribucija inhibicijskih zona *Klebsiella pneumoniae* (N=12) testiranih na nitroxolin disk difuzijskom metodom



Slika 10. Distribucija inhibicijskih zona *Pseudomonas aeruginosa* (N=15) testiranih na nitroxolin disk difuzijskom metodom

5. RASPRAVA

Interpretirajući dobivene rezultate dolazimo do spoznaje da na ukupno 50 uzoraka tri bakterijske vrste *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, najveću osjetljivost na antibiogramu nitroxolina značajno pokazuje *E. coli*, a prati ju *K. pneumoniae* dok je *P. aeruginosa* rezistentna.

Ovo istraživanje možemo usporediti s istraživanjem u Hrvatskoj gdje se ispitivala osjetljivost nekoliko multirezistentnih nozokomijalnih bakterijskih izolata na fosfomicin i nekoliko drugih antibiotika. Spomenutim istraživanjem dokazano je da su *E. coli* i *K. pneumoniae* ESBL soja pokazale veliku osjetljivost na fosfomicin s razlikom što je u tom istraživanju veće zone minimalne inhibitorne koncentracije imala *Klebisella pneumoniae* dok je u ovom istraživanju iste parametre imala *E. coli* (23).

Još jedno hrvatsko istraživanje odnosilo se upravo na ispitivanje osjetljivosti *E. coli* na nitroxolin kao opciju liječenja nekompliciranih urinarnih infekcija. Prema podacima dobivenim testiranjem izolata *E. coli*, svi su pokazali potpunu osjetljivost na nitroxolin, ali i na druge antibiotike poput imipenema, meropenema, amikacina i fosfomicina. Kontrolom kvalitete *E. coli* ATCC 25922 potvrđene su preporučene inhibicijske zone nitroxolina prema EUCAST-u (18 – 24 mm). Također su testirani izolati pokazali normalnu distribuciju vrijednosti od 16 mm do 21 mm. Uspoređujući ove podatke s podacima koje smo dobili u našem istraživanju, izolati *E. coli* ESBL soja nalikuju navedenim vrijednostima distribucije obuhvaćajući zone od 18 mm do 26 mm, sa svega nekoliko rezistentnih izolata – od 23 izolata *E. coli*. Ukupno 3 (13%) izolata pokazala su rezistenciju na nitroxolin dok je 20 (87%) izolata *E. coli* osjetljivo na nitroxolin (24).

Zbog potvrde većeg postotka rezistencije kod *P. aeruginosa,* može se pretpostaviti da se nastavlja već dovoljno kompliciran problem liječenja ove nozokomijalne, multiplo rezistentne bakterije. Naime, liječenje iziskuje kombinirane terapije, no izbor antibiotika je ograničen. Ukoliko je bakterija rezistentna na ciprofloksacin, ne možemo uporabiti niti jedan florokinolon, a ukoliko su zahvaćeni svi β-laktamski antibiotici, florokinoloni, aminoglikozidi, pa čak i polimiksin kolistin na koji se polako, ali sve češće javlja rezistencija, izbor temeljem rezultata testiranja značajno reduciran ili potpuno izostaje (25).

U ovom istraživanju *Klebsiella pneumoniae* pokazuje veći postotak osjetljivih uzoraka u odnosu na rezistentne, no u odnosu na *E. coli* i *K. pneumoniae* primjećujemo značajno veći broj rezistentnih izolata *P. aeruginosa* što su potvrdila i prethodna istraživanja, poput onog s fosfomicinom gdje su se testirale također ove tri vrste bakterija, a *E. coli* i *K. pneumoniae* ESBL soja su pokazale dobru osjetljivost na fosfomicin (26).

Također, nitroxolin možemo razmatrati kao potencijalni agens u sprječavanju širenja rezistencije na karbapeneme. Naime, u sve više slučajeva pojavljuje se *K. pneumoniae* koja izlučuje karbapenemaze te na takav način širi rezistenciju što može i potvrditi istraživanje gdje su infekcije mokraćnih puteva nakon transplatacije bubrega bila uzrokovane karbapenem rezistentnom gram-negativnom bakterijom, odnosno bakterijom multirezistentnom na antibiotike, kakva upravo može biti *Klebsiella pneumoniae* (27).

Sukladno navedenim podacima do sada, možemo razmatrati kliničku važnost nitroxolina. Gledajući podatke o osjetljivosti izolata *E. coli*, uočavamo najveći broj dokazano osjetljivih izolata na nitroxolin u ovom istraživanju, ali i u ostalim navedenim istaživanjima. Također, primjećujemo i da su zone inhibicije najvećeg raspona upravo kod *E. coli* ESBL soja. Takav zaključak nam daje mogućnost korištenja nitroxolina u svrhu liječenja infekcija urinarnog sustava s *E. coli* kao najčešćega uzročnika, ali i *K. pnemoniae*, s obzirom na sve veći broj osoba koje pokazuju značajne rezistencije na uobičajeno korištene antibiotike poput ampicilina, cefalosporina i kinolona.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata slijede zaključci.

- Ukupno je bilo 29 (58%) osjetljvih uzoraka, a 21 (42%) rezistentnih uzoraka na testiranih 50.
- Najviše osjetljivih uzoraka primijećeno je kod *E .coli*, od 23 uzorka 20 (87%) bilo je osjetljivih, a 3 (13%) rezistentna.
- *K. pneumoniae* se u 8 (66,67%) testiranih izolata pokazala osjetljiva od ukupnih 12 dok se u 4 (33,33%) pokazala rezistencija.
- *P. aeruginosa* se u 1 (7%) pokazala kao osjetljivi izolat, no u 14 (93%) uzoraka pokazala je rezistentnost na ukupnih 15 uzoraka.
- U istraživanju je vidjivo da nitroxolin ima sposobnost antibakterijskog djelovanja na testirane izolata, posebno na *E. coli*, dok na *P. aeruginosa* pokazuje značajno nižu sposobnost djelovanja.
- Osjetljivost je na nitroxolin skoro potpuna za *E. coli* ESBL soja kao i na fosfomicin što je dokazano u drugim istraživanjima.
- U vrijeme sve veće rezistencije na karbapeneme nitroxolin postaje sredstvo sprječavanja širenja rezistencije na karbapeneme.
- Rezultati pokazuju potencijal nitroxolina koji može doprinijeti boljem razumijevanju djelovanja i mogućnosti korištenja u svrhe liječenja nekompliciranih infekcija urinarnih puteva.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Svrha ovoga istraživanja bila je testirati osjetljivost kliničkih rezultata multirezistentnih bakterija: *Escherichia coli* ESBL soj, *Klebsiella pneumonia* ESBL soj i *Pseudomonas aeruginosa* na 5-nitro-8-hydroxyquinolin disk-difuzijskom metodom, interpretirati rezultate osjetljivosti i usporediti osjetljivost između bakterijskih vrsta.

Materijali i metode: U istraživanju je korišteno 50 gram-negativnih izolata tri bakterijske vrste: *E. coli, K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* dobivenih iz kliničkih rezultata. Nakon uzgoja, pripreme i inkubacije na Mueller-Hintonovom agaru, očitane su zone inhibicija za svaki nasađeni soj. Mjereno je ravnalom u milimetrima i klasificirano sukladno veličini zone u tri kategorije: senzitivan (S), intermedijarno senzitivan (I) i rezistentan (R).

Rezultati: Rezultati su pokazali da nitroxolin uspješno i statistički značajno (Hi-kvadrat test, $P < 0,001$) pokazuje antibakterijsko djelovanje na sve tri bakterijske vrste. Ukupno je 29 (58%) osjetljivih uzoraka od ukupno 50 testiranih izolata. Značajno je više 20 (87%) *E. coli*, potom *K. pneumoniae* 8 (66,77%), najmanje *P. aeruginosa* (7%) . Rezistentni su uzorci značajno češći kod *P. aeruginosa* (93%), no treba obratiti pozornost da su korišteni podaci EUCAST standarda (European Committee on Antimicrobal Susceptibility Testing) za enterobakterije u ovom radu u nedostatku standarda za nitroxolin *i Pseudomonas* spp.

Zaključak: Rezultati ovoga istraživanja upućuju na poznate spoznaje o osjetljivosti navedenih bakterijskih vrsta na nitroxolin te mogu doprinijeti boljem razumijevanju djelovanja i mogućnosti korištenja antibiotika u svrhe liječenja nekompliciranih urinarnih infekcija.

Ključne riječi: *E. coli*, *K. pneumonia*, nitroxolin, osjetljivost, *P. aeruginosa*, rezistencija

8. SUMMARY

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 5-NITRO-8-HYDROXYQUINOLINE AGAINST MULTIDRUG RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Objectives: The aim of this research is to examine the sensitivity of the clinical results of multi-resistant bacteria: *Escherichia coli* ESBL strain, *Klebsiella pneumonia* ESBL strain and *Pseudomonas aeruginosa* to the 5-nitro-8-hydroxyquinoline disc-diffusion method, as well as to interpret and compare this sensitivity with a variety of other bacterial species.

Matherial and method: 50 gram negativne isolates of three bacterial species obtainted from clinical specimens were used for this research. After breeding, preparing and incubation at Mueller-Hinton agar, inhibition zones for each strain were read and measured by the ruler in millimeters. The final results were classified into 3 categories: sensitive (S), intermediate sensitive (I) and resistant (R).

Results: Results showed that nitroxolin, successfully (Hi-quadrat test, $P < 0.001$) exhibits statistically significant antibacterial activity on all three bacterial species. There were 29 (58%) susceptible samples from a total of 50 tested isolates, featuring significantly more *E. coli* 20 (87%), then follows *K. pneumoniae* 8 samples (66.77%) whereas *P. aeruginosa* was least represented with 7%. Resistant samples were more frequent with *P. aeruginosa* (93%), but it should be taken ino account that the standards used were those for enterobacteria in the absence of standards for nitroxolin and *Pseudomonas* spp.

Conclusion: The results of this study refer to known facts of the sensitivity of these bacterial species to nitroxolin and can contribute to a better understanding of the effects and the options for the use of antibiotics in the treatment of uncomplicated urinary infections.

Keywords: *E. coli*, *K. pneumonia*e, nitroxolin, *P. aeruginosa*, resistance, sensitivity

9. LITERATURA

1. Kalenić S i sur. 2013. Medicinska mikrobiologija. 14. izd. Medicinska naklada. Zagreb.
2. Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. BioMed Research International/2016:2475067. doi:10.1155/2016/2475067.
3. Bergogne-Berezin E, Berthelot G, Muller-Serieys C. 1987. Present status of nitroxoline. Pathol Biol (Paris). Jun;35(5 Pt 2):873-8.
4. Sobke A, Klinger M, Hermann B, et al. 2012. The Urinary Antibiotic 5-Nitro-8-Hydroxyquinoline (Nitroxoline) Reduces the Formation and Induces the Dispersal of Pseudomonas aeruginosa Biofilms by Chelation of Iron and Zinc. Antimicrobial Agents and Chemotherapy/56(11):6021-6025. doi:10.1128/AAC.01484-12.
5. Kresken M, Körber-Irrgang B. 2014. In vitro activity of nitroxoline against Escherichia coli urine isolates from outpatient departments in Germany. Antimicrob Agents Chemother/58(11):7019–20.
6. Wagenlehner FME, Münch F, Pilatz A, et al. 2014. Urinary Concentrations and Antibacterial Activities of Nitroxoline at 250 Milligrams versus Trimethoprim at 200 Milligrams against Uropathogens in Healthy Volunteers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy/58(2):713-721. doi:10.1128/AAC.02147-13.
7. Abouelhassan Y, Yang Q et al. Nitroxoline: a broad-spectrum biofilm-eradicating agent against pathogenic bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents , Volume 49, Issue 2, 247 – 251.
8. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Krnjajić D, Petrović. 2008. J. Biofilm - organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. Arhiv veterinarske medicine/1(2).
9. Vraneš J, Leskovar V. 2009. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. Med glas/ 6(2):147-164.
10. Sobke A et al. Empirical treatment of lower urinary tract infections in the face of spreading multidrug resistance: in vitro study on the effectiveness of nitroxoline. International Journal of Antimicrobial Agents , Volume 51 , Issue 2/ 213 – 220.
11. Damjanov I, Jukić S, Nola M. 2011. Patologija. 3.izd. Medicinska naklada. Zagreb.
12. Šimunić V i sur. 2001. Ginekologija. Naklada Ljevak d.o.o. Zagreb.

13. Holte HH, Underland V, Hafstad E. Mars 2016. Systematic reviews on preventing catheterassociated urinary tract infection. Folkehelseinstituttet. Research overview ISBN: 978-82-8082-722-7.
14. Peterson LR. September 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited, Clinical Infectious Diseases, Volume 49, Issue 6, 15, Pages 992–993.
15. Brooks LE, Ul-Hasan S, Chan BK, Sistrom MJ. 2018. Quantifying the Evolutionary Conservation of Genes Encoding Multidrug Efflux Pumps in the ESKAPE Pathogens To Identify Antimicrobial Drug Targets. Mackelprang R, ed. mSystems/ 3(3):e00024-18. doi:10.1128/mSystems.00024-18.
16. Medscape. Klebsiella Infections Clinical Presentation. https://emedicine.medscape.com/article/219907-clinical. (pristupljeno 18. kolovoza 2018.)
17. Medscape. Escherichia coli (E coli) Infections. https://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#a5. (pristupljeno 18.kolovoza 2018.)
18. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. 2017. UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. Frontiers in Microbiology/8:1566. doi:10.3389/fmicb.2017.01566.
19. Ahmed MN, Porse A, Sommer MOA, Høiby N, Ciofu O. 2018. Evolution of antibiotic resistance in biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa populations exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 62:e00320-18. https://doi.org/10.1128/AAC.00320-18.
20. Medscape. Pseudomonas aeruginosa Infections. https://emedicine.medscape.com/article/226748-overview (pristupljeno 18. kolovoza 2018.)
21. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories Matuschek, E. et al. Clinical Microbiology and Infection , Volume 20 , Issue 4 , O255 - O266.
22. European committee on antimicrobial susceptibility testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (pristupljeno 18. kolovoza 2018.)

23. Bielen L, Likić R, Erdeljić V, et al. 2018. Activity of fosfomycin against nosocomial multiresistant bacterial pathogens from Croatia: a multicentric study. Croatian Medical Journal/59(2):56-64. doi:10.3325/cmj.2018.59.56.
24. Mareković I, Bošnjak Z, Jurić K, Ćorić M, Popović-Grle S. 2018. Susceptibility of Escherichia coli to nitroxoline, an option for uncomplicated urinary tract infections – the first report from Croatia, Journal of Chemotherapy/30:3, 189-191.
25. Gužvinec M, Butić I, Jelić M, Bukovski S, Lucić S, Tambić Andrašević A. 2012. Rezistencija na antibiotike u bakterije Pseudomonas aeruginosa. Infektiološki glasnik 32;2, 71-80.
26. De Cueto M, López L, Hernández JR, Morillo C, Pascual A. 2006. In Vitro Activity of Fosfomycin against Extended-Spectrum-β-Lactamase- Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: Comparison of Susceptibility Testing Procedures. Antimicrobial Agents and Chemotherapy/50(1):368-370. doi:10.1128/AAC.50.1.368-370.
27. Freire MP, Mendes CV, Piovesan AC, de Paula FJ, Spadão F, Nahas WC, David-Neto E, Pierrotti LC. Does the urinary tract infection caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli impact the outcome of kidney transplant recipients?. Transpl Infect Dis. 2018 Aug;20(4):e12923. doi: 10.1111/tid.12923. Epub 2018 Jun 13.

10. ŽIVOTOPIS

Vlatka Stojačić
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Medicinski fakultet Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko – laboratorijske dijagnostike
Josipa Hutlera 4
31000 Osijek

Datum i mjesto rođenja:

4 . srpnja 1996., Vinkovci

Kućna adresa:

Vatrogasna ulica 22, 32100 Vinkovci

Telefon:

+385996979465

E-mail: vstojacic@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011.: OŠ Ivana Mažuranića Vinkovci;

2011. – 2015.: Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija Matija Antuna Reljkovića Vinkovci;

2015. – 2018.: Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijska dijagnostika, Osijek

Članstvo i aktivnosti u znanstvenim i strukovnim udrugama:

2015. – 2018. CMLDSA (Hrvatska udruga studenata medicinsko – laboratorijske dijagnostike)