

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike**

**Marina Dujmić Ilić**

**REZISTENCIJA BAKTERIJSKIH  
SOJEVA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* I  
*ENTEROBACTER CLOACAE*  
IZOLIRANIH IZ UZORAKA URINA NA  
 $\beta$ -LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike**

**Marina Dujmić Ilić**

**REZISTENCIJA BAKTERIJSKIH  
SOJEVA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* I  
*ENTEROBACTER CLOACAE*  
IZOLIRANIH IZ UZORAKA URINA NA  
 $\beta$ -LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2015.**

Rad je ostvaren u Službi za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije u Slavonskom Brodu.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Maja Miškulin, dr. med. specijalist epidemiologije i zdravstvene ekologije

Rad ima 36 listova, 6 tablica, 2 slike

*Na početku,*

*Želim najprije zahvaliti svima koji su mi omogućili lijep završetak ovog bitnog životnog razdoblja, koje je meni bilo predivno.*

*Najprije, željela bih zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Miškulin, dr. med., na poticanjima, trudu, lijepim riječima, strpljenju, kao i na svim savjetima tijekom pisanja ovog rada. Najveća joj hvala na tome što je na mene prenijela želju za stalnim napredovanjem i obrazovanjem, a posebno na tome što je u meni potaknula želju za istraživačkim radom.*

*Također veliko hvala prim. mr. sc. Maji Tomić Paradžik, dr.med.,spec.med.mikrobiologije s parazitologijom pomoći tijekom izrade rada, kao i na strpljenju, savjetima i ohrabrivanju te pomoći oko stručne literature.*

*Željela bih se zahvaliti i svojim kolegama i kolegicama iz Mikrobiološkog laboratorija Službe za kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije na pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela rada, kao i spremnosti za pomoć.*

*Svojim prijateljicama bih željela zahvaliti na podršci svih ovih godina.*

*Najveće zahvale idu cijeloj mojoj obitelji, a posebno roditeljima i suprugu kojima posvećujem ovaj rad i koji su mi tijekom studiranja bili najjači oslonac i najveća podrška u svakom trenutku. Hvala na svakom ohrabrivanju, ljubavi, poticanju i žrtvovanju tijekom svih ovih godina.*

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Infekcije mokraćnog sustava i najčešći uzročnici .....	1
1.2. Porodica <i>Enterobacteriaceae</i> , rodovi <i>Klebsiella</i> i <i>Enterobacter</i> .....	2
1.3. Antibiotici i posljedice njihovog korištenja .....	3
1.4. Rezistencija bakterija na antibiotike .....	4
1.5. Betalaktamski antibiotici .....	4
1.5.1. Penicilini .....	5
1.5.2. Cefalosporini i rezistencija na cefalosporine .....	5
1.6. ESBL sojevi enterobakterija i produkcija AmpC $\beta$ -laktamaza .....	6
1.7. Karbapenemi i rezistencija bakterija na karbapeneme .....	6
2. Ciljevi istraživanja .....	8
3. Ispitanici i metode.....	9
3.1. Ustroj studije .....	9
3.2. Ispitanici.....	9
3.3. Metode .....	11
3.3.1. Testiranje osjetljivosti na antibiotike (cefoksitin).....	11
3.3.2. Testiranje bakterijskih sojeva <i>K. pneumoniae</i> i <i>E. cloacae</i> na produkciju ESBL.....	11
3.3.3. Testiranje bakterijskih sojeva <i>K. pneumoniae</i> i <i>E. cloacae</i> na produkciju AmpC $\beta$ -laktamaza.....	12
3.3.4. Testiranje bakterijskih sojeva <i>K. pneumoniae</i> i <i>E. cloacae</i> na produkciju karbapenemaza.....	13
3.4. Statističke metode.....	14
4. Rezultati .....	15
4.1. Demografska obilježja ispitanika .....	15
4.2. Učestalost odabranih bakterijskih sojeva izoliranih kod ispitanika .....	16
4.4. Učestalost rezistencije na karbapeneme kod odabranih bakterijskih sojeva .....	21

5. Rasprava.....	22
6. Zaključak .....	27
7. Sažetak .....	28
8. Summary.....	30
9. Literatura.....	32
10. Životopis .....	35

## 1. Uvod

### 1.1. Infekcije mokraćnog sustava i najčešći uzročnici

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) su najučestalije bakterijske infekcije u odrasloj dobi. Najčešće su bakterijske infekcije u žena te se smatra da će 40 % – 50 % žena barem jednom u tijeku života doživjeti simptomatsku infekciju mokraćnog sustava, a 20 % žena s IMS doživi rekurirajuću IMS unutar šest mjeseci. Učestalost bakteriurije u odraslih muškaraca je niska, ali se povećava u starijoj životnoj dobi, što je povezano s učestalijom bolesti prostate (1,2).

IMS su nerijetko uzrokovane bakterijama koje su dio fiziološke crijevne flore, i to enterobakterijama, pri čemu je najčešća *Escherichia coli* (*E. coli*). U posebnim uvjetima IMS mogu izazvati i druge gram-negativne i gram-pozitivne bakterije (1).

Kod prvih akutnih IMS najčešći uzročnik je *E. coli*, a kod kompliciranih IMS s većom učestalošću javljaju se i druge enterobakterije poput *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. te non-fermentori *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. Gram-pozitivni uzročnici rjeđe uzrokuju IMS (1).

Jasan rizični čimbenik za stjecanje IMS s rezistentnim uzročnikom infekcije je prethodna upotreba antibiotika. Rizični čimbenici za stjecanje infekcije multirezistentnim sojevima su brojni, a najvažniji su: prethodna hospitalizacija, uporaba kortikosteroida, dijabetes, kronična neurološka ili urološka bolest, boravak u domovima za stare i nemoćne, putovanje u regije s visokom incidencijom rezistentnih sojeva. Ono što pogoduje razvoju rezistencije na antibiotike jest korištenje nedovoljne koncentracije antibiotika (subinhibitorne doze) i/ili prekratko vrijeme primjene, te je zbog toga potrebno antibiotsku terapiju prilagoditi osobitostima bolesnika i karakteristikama izoliranog patogena.

Najrezistentniji uzročnici očekuju se u grupi bolesnika s kompliciranim i ponavljajućim IMS. Kod takvih bolesnika vrlo često su prisutni brojni drugi rizični čimbenici poput dijabetesa, kroničnog prostatitisa, prisutnosti stranih tijela (kamenje ili pijesak u mokraćnom sustavu, urinarni kateter), primjena kortikosteroida i drugih imunosuprimirajućih lijekova itd.

Najbolja osjetljivost očekuje se kod sojeva izoliranih u slučajevima nekompliciranih infekcija (cistitis, pijelonefritis) (1).

U proteklih pedesetak godina primjećen je značajan porast bakterijskih infekcija uzrokovanih rezistentnim, gram-negativnim patogenima a razlozi koji tome doprinose su neracionalna i

nesavjesna primjena antibiotika, starenje populacije, razne ovisnosti (alkoholizam, i.v. primjena droga, itd.), primjena imunosuprimirajućih i citotoksičnih lijekova te brojne invazivne dijagnostičke i terapijske metode koje doprinose porastu infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama. U humanoj, veterinarskoj medicini i poljodjelstvu koriste se velike količine antimikrobnih sredstava što također ima utjecaj na nastanak otpornosti bakterija na antibiotike. Posljedično, na raspolaganju nam je sve manji broj djelotvornih antimikrobnih lijekova što otežava liječenje ne samo IMS već i brojnih drugih infektivnih stanja (3).

## **1.2. Porodica *Enterobacteriaceae*, rodovi *Klebsiella* i *Enterobacter***

Enterobakterije su velika porodica gram-negativnih štapića. U čovjekovom organizmu čine 1-2% ukupne normalne crijevne flore, a od 50 rodova 49 vrsta uzrokuje infekcije u ljudi. Ne stvaraju spore, fakultativni su anaerobi te je većina pokretna, a neki od njih imaju kapsulu. Enterobakterije su većinom uvjetni, oportunistički, patogeni te je samo 5 vrsta striktnih patogena.

Rod *Klebsiella* se vrlo često izolira iz kliničkih uzoraka a najčešći uzročnik infekcije kod ljudi je *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Ona je čest komenzal u probavnom sustavu čovjeka i životinja i može živjeti slobodna u prirodi. Značajna je njena otpornost prema antibioticima jer je primarno otporna na ampicilin i karbenicilin, a u bolničkoj sredini vrlo lako stječe otpornost prema većini antibiotika u primjeni. Uzrokuje pneumoniju (3 % svih bakterijskih penumonija), infekcije mokraćnog sustava te brojne infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi (nekada „bolničke infekcije“), od kojih su najteže sepsa i meningitis. Unatrag dvadesetak godina javlja se sve veći broj sojeva rezistentnih na  $\beta$ -laktamske antibiotike zahvaljujući stvaranju enzima  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended Spectrum Beta-lactamases* -ESBL). Posljedično, radi velike primjene karbapenema u terapiji infekcija uzrokovanih sa ESBL pozitivnim sojevima *K. pneumoniae*, od 2008. godine sve je češća pojavnost sojeva rezistentnih i na tu, zadnju liniju djelotvornih antibiotika.

Rod *Enterobacter* također je čest komenzal u probavnom sustavu ljudi i životinja i može živjeti slobodno u prirodi. U čovjeka izazivaju bolesti samo kao oportunistička bakterija i česti su uzročnici infekcija u bolničkoj sredini. Osjetljivi su na cefalosporine treće i četvrte



generacije, karbapeneme, kinolone i aminoglikozide, ali u bolničkoj sredini vrlo lako stječu otpornost na brojne antibiotike. Najčešće vrste izolirane iz bolesničkih uzoraka su *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), *E. aerogenes*, *E. sakazaii*. Uglavnom se javljaju nakon dijagnostičko-terapijskih instrumentalnih zahvata, kao uzročnici infekcija kirurške rane i urinarnih infekcija povezanih s kateterizacijom (4).

### **1.3. Antibiotici i posljedice njihovog korištenja**

Glavno obilježje antibiotika je njihova selektivna toksičnost. To znači da su toksični za bakterije, a netoksični (ili prihvatljivo toksični) za ljudski organizam. Antibiotici su dijelom prirodni proizvodi gljiva ili nekih bakterija, a dijelom su sintetički lijekovi.

Antibiotike možemo prema mjestu djelovanja podijeliti u sljedeće četiri skupine:

1. antibiotici koji djeluju na bakterijsku staničnu stijenku (beta-laktamski antibiotici, glikopeptidi, bacitracin)
2. antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku opnu (polimiksini)
3. antibiotici koji sprječavaju sintezu proteina (aminoglikozidi, tetraciklini, glicilciklini, kloramfenikol, makrolidi i drugi)
4. antibiotici koji sprječavaju sintezu nukleinskih kiselina (kinoloni, metronidazol i drugi).

Djelovanjem na staničnu stijenku zapravo se djeluje na sintezu prekursora peptidoglikana ili na sastavljanje prekursora u staničnoj stijenci i formiranje peptidoglikanskog sloja. Kako ljudske stanice ne posjeduju peptidoglikan, koristeći ovu skupinu antibiotika moguće je postići selektivnu toksičnost u velikoj mjeri. Najznačajniji antibiotici koji se nalaze u ovoj skupini su betalaktamski antibiotici i glikopeptidi (4).

Upravo su betalaktamski antibiotici najčešće korišteni antibiotici za liječenje bakterijskih infekcija i to zbog niske toksičnosti, a visoke baktericidnosti i širokog spektra djelovanja (6).

Često bakterije na njih imaju izvrsno razvijene mehanizme genetske prilagodbe. Zbog toga je posljedica uporabe antibiotika uvijek - brži ili sporiji - razvoj rezistencije bakterija na njih. Tijekom liječenja bakterija antibiotici ne djeluju samo na patogene bakterije nego i na

bakterije normalne flore. Tako se rezistencija razvija i u bakterija normalne flore, te se tako stvaraju rezervoari gena rezistencije u prirodi (6).

#### **1.4. Rezistencija bakterija na antibiotike**

Na svaki antibiotik, već u vrijeme njegovog sintetiziranja i stvaranja postoje otporni sojevi, dok na njega osjetljivi s vremenom stvaraju rezistenciju, a sama brzina nastanka rezistencije može, ali i ne mora biti linearna s opsegom potrošnje antibiotika. Rezistencija bakterija na antibiotike vrlo je raznolika u različitim područjima svijeta, na istom kontinentu, u pojedinim regijama iste države, ali i na različitim odjelima jedne te iste bolnice. Zbog toga je potrebno pratiti razvoj rezistencije na antibiotike u lokalnoj sredini (5).

U današnje vrijeme, zahvaljujući brojnim migracijama ljudi (turističkih, poslovnih, kao posljedica ratnih zbivanja) s kontinenata na kontinente, od iznimne je važnosti dobro poznavati sve rizične čimbenike te lokalnu prevalenciju patogena i njihovu osjetljivost na antibiotike.

#### **1.5. Betalaktamski antibiotici**

Betalaktamski antibiotici su antibiotici koji djeluju na sintezu stanične stijenke. Oni u svojoj strukturi imaju betalaktamski prsten, a na njemu se temelji djelovanje ove skupine antibiotika, kao i pojava rezistencije na njih.

Betalaktamski antibiotici djeluju na sintezu stanične stijenke, na način da interferiraju sa sintezom stanične stijenke bakterije. Najvažnija komponenta stanične stijenke – peptidoglikan – daje bakteriji čvrstoću i otpornost na mehanička i osmotska oštećenja. Vezanjem betalaktamskih antibiotika za PBP (engl. *penicilin binding protein*) dolazi do poremećaja sinteze peptidoglikana, što za posljedicu ima smrt bakterije. Zbog poremećene sinteze stijenke bakterija nije u mogućnosti održavati osmotski gradijent između stanice i njene okoline pa stanica nabubri i puca. Uz to, nakon što se stanična stijenka prestane sintetizirati dolazi do aktivacije apoptoze i lize stanice.

Betalaktamski antibiotici su najčešći antibiotici u kliničkoj primjeni upravo zbog svoje niske toksičnosti i visoke djelotvornosti. Kao posljedica čestog korištenja je pojava rezistencije na njih, što je zabrinjavajuće.

### 1.5.1. Penicilini

Penicilini su poznati kao antibiotici visoko učinkoviti i netoksični, a dobivaju se iz plijesni *Penicillium chrysogenum*. Molekula penicilina se sastoji od betalaktamskog prstena i tiazolidinskog prstena. Neki od poznatijih predstavnika su: meticilin, kloksacilin, ampicilin, amoksicilin, piperacilin, amoksicilin/klavulanska kiselina, piperacilin/tazobaktam i brojni drugi.

### 1.5.2. Cefalosporini i rezistencija na cefalosporine

Cefalosporini su prvi puta dobiveni iz kulture plijesni *Cephalosporium notatum*, a struktura i mehanizam djelovanja im je sličan strukturi penicilina. Uz betalaktamski prsten imaju i dihidrotiazinski. Karakteristika ove skupine betalaktamskih antibiotika je širok spektar aktivnosti i niska toksičnost. Cefalosporini su klasificirani u četiri skupine, odnosno četiri generacije. Prva generacija cefalosporina je uskog spektra djelovanja te djeluju na gram-pozitivne koke, ali su slabo osjetljivi na gram-negativne bakterije (djeluju na *E. coli*, *P. mirrabilis* i *K. pneumoniae*). Neki od predstavnika su cefazolin, cefradin i cefalotin.

Drugu generaciju čine cefalosporini širokog spektra, a imaju antistafilokoknu aktivnost te djeluju i na neke gram-negativne bakterije (*Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*). Neki od predstavnika su cefoksitin i cefuroksim. Treću generaciju čine cefalosporini proširenog spektra djelovanja. Kako su stabilni prema  $\beta$ -laktamazama koje proizvode gram-negativne bakterije, pogodni su za liječenje infekcija koje su njima uzrokovane. U ovoj skupini neki od predstavnika su: ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson. Osamdesetih godina dvadesetog stoljeća su opisane  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra koje hidroliziraju ove antibiotike i onemogućuju njihovu djelotvornost. Također, ova generacija cefalosporina osjetljiva je i na djelovanje plazmidnih AmpC betalaktamaza, metalo-betalaktamaza i karbapenem hidrolizirajućih oksacilinaza. Četvrta generacija cefalosporina obuhvaća sljedeće cefalosporine: cefpirom, cefepim, cefaciklin i druge. Njihova aktivnost prema gram-negativnim bakterijama je snažnija, a imaju i veću stabilnost prema  $\beta$ -laktamazama koju im daje kvarterni amonijev ion (4).

Produkcija ESBL uzrokuje rezistenciju na cefalosporine treće i četvrte generacije. Prva takva opisana rezistencija je SHV-2 beta-laktamaza pronađena u Njemačkoj 1983.godine u izolatu

*lebsiella .oxytoca*.  $\beta$  -laktamaze proširenog spektra se dijele u tri velike skupine: TEM, SHV i CTX-M  $\beta$  -laktamaze.

Rezistencija na  $\beta$  -laktamaze proširenog spektra mogu nastati i zbog hiperprodukcije kromosomske ili zbog plazmidne AmpC beta-laktamaze. Plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze su nastale prijelazom kromosomskog AmpC gena bakterija *Enterobacter*, *Serratia* i *Pseudomonas* na plazmid (4).

ESBL razaraju sve  $\beta$  -laktame osim karbapenema. Kao i  $\beta$  -laktamaza širokog spektra i ESBL su osjetljive na inhibitore  $\beta$ -laktamaza (klavulansku kiselinu, sulbaktam i tazobaktam) ukoliko količina proizvedenog enzima nije prevelika za kapacitet inhibitora (1).

#### **1.6. ESBL sojevi enterobakterija i produkcija AmpC $\beta$ -laktamaza**

ESBL sojevi *E. coli* i *K. pneumoniae* su bili prisutni od samog početka praćenja 1990-tih godina, a rezistencija na cefalosporine treće generacije posredovana plazmidnim AmpC  $\beta$ -laktamazama prvi put je u Hrvatskoj opisana 2003.godine. Bakterijski sojevi koji produciraju ESBL su često multiplorezistentni. Pravi su izazov u liječenju bolničkih infekcija, pogotovo kritičnih bolesnika. Karbapenemi su antibiotici prvog izbora u liječenju teških infekcija uzrokovanih sojevima koji proizvode ESBL (5).

Proizvodnja AmpC  $\beta$ -laktamaza u divljih izolata navedenih vrsta je inducibilna, dok se kod mutiranih jedinki hiperprodukcija ovih enzima izražava kao konstitutivna osobina. Ubrzo dolazi do daljnjeg širenja rezistencije pa geni za AmpC  $\beta$ -laktamaze prelaze na plazmide. To je uzrokovalo širenje ove rezistencije na bakterijske vrste koje prirodno ne posjeduju kromosomske AmpC  $\beta$ -laktamaze (poput *E. coli* i *K. pneumoniae*) (5).

#### **1.7. Karbapenemi i rezistencija bakterija na karbapeneme**

Karbapenemi su semisintetički derivat tienamicina koji proizvodi *Streptomyces* spp. Od karbapenema se prvi koristio imipenem, a zatim meropenem i ertapenem, dok se na američkom tržištu može pronaći i doripenem. Karbapenemi imaju najširi spektar djelovanja i snažno antibakterijsko djelovanje na gram-pozitivne koke, većinu enterobakterija (uključujući i one rezistentne na ostale  $\beta$  -laktame) i nefermentativne bakterije (4).

Po molekularnoj strukturi karbapenemaze koje uzrokuju stečenu rezistenciju na karbapeneme dijelimo u skupine A, B i D.

U grupi A su karbapenemaze inhibirane klavulanskom kiselinom te su vrlo rijetke. Ove vrste karbapenemaza hidroliziraju peniciline, prvu i drugu generaciju cefalosporina, aztreonam i karbapeneme (jače imipenem nego meropenem). Najveće kliničko značenje u ovoj skupini karbapenemaza imaju KPC beta-laktamaze koje se pojavljuju kod bakterije *Klebsiella*, a opasne su zbog potencijala za epidemijsko širenje jer su kodirane plazmidno, a uzrokuju visok stupanj rezistencije na karbapeneme (4).

U grupi B su metalo-beta-laktamaze koje kao kofaktor trebaju cink, a osjetljive su na inhibiciju metalnim-kelatorima kao što su EDTA, merkaptooctena i merkaptopropionska kiselina. U ovoj skupini nalazimo ove porodice  $\beta$ -laktamaza: IMP, VIM, SIM, SPM, GIM i druge, a za Europu su karakteristične VIM metalo-beta-laktamaze. U Hrvatskoj je opisana rezistencija na karbapeneme u *K. pneumoniae* uzrokovana produkcijom KPC-2 betalaktamazama, a kod *E. cloacae* je rezistencija na karbapeneme opisana zbog produkcije VIM-1 metalo-  $\beta$  -laktamaza (4).

## 2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su :

1. Utvrditi učestalost različitih vrsta rezistencije bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na  $\beta$ -laktamske antibiotike u uzrocima urina bolničkih i izvanbolničkih pacijenata s područja Brodsko-posavske županije pomoću disk difuzije, određivanjem MIK-a ili uz pomoć fenotipizacije.
2. Procijeniti postoji li razlika u učestalosti pojave rezistencije između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata.

### **3. Ispitanici i metode**

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

Provedeno istraživanje ustrojeno je prema načelu presječnog (*cross-sectional*) istraživanja, odnosno kao tipična metoda istraživanja presjeka ili prevalencije. Ova metoda ubraja se u opazajni tip epidemioloških istraživanja, a ovisno o glavnom cilju može biti i deskriptivne i analitičke prirode. Ukoliko je glavni cilj mjerenje samo prevalenciju neke bolesti ili rizičnog čimbenika „presjekom“ zdravstvenog stanja populacije, radi se o deskriptivnom pristupu, dok se o analitičkom tipu istraživanja radi ukoliko se u nekom vremenskom roku prikupljaju i podaci o zdravstvenom statusu ispitanika (zdrav-bolestan), kako bi se utvrdila njihova povezanost (7).

U ovom analitičkom presječnom istraživanju ispitujemo prisutnost različitih oblika rezistencije bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* u uzorcima urina bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, te utvrđujemo postoji li razlika u učestalosti pojave rezistencije između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata.

Glavne prednosti ovog istraživanja su jednostavnost njegova ustroja (dizajna) u odnosu na druga istraživanja. Osim jednostavnosti, među prednosti ovoga istraživanja možemo ubrojiti kratko vremensko trajanje jer nije potrebno pratiti ispitanike u vremenu do trenutka razvoja bolesti. Jedan od glavnih nedostataka ovog istraživanja je nemogućnost pouzdanog određivanja vremenskog slijeda događaja (7).

#### **3.2. Ispitanici**

Svi ispitanici koji su sudjelovali u ovom istraživanju su dobrovoljno sudjelovali nakon potpisivanja suglasnosti za sudjelovanje. Ispitanici su bili odrasle osobe sa područja Brodsko-posavske županije koje su se javile na Službu za Kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije. Analizirano je 100 uzoraka urina u kojima su izolirani bakterijski sojevi *K. pneumoniae* i *E. cloacae*, pri čemu je njih 50 pripadalo bolničkim pacijentima, a 50 izvanbolničkim pacijentima. Bolnički pacijenti bili su svi pacijenti koji su se liječili u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Pod pojmom bakterijske infekcije podrazumijevaju se sve infekcije koje su nastale tijekom boravka u bolnici, odnosno izolacija bakterijskih kultura koje su prikupljene u razoblju od 48-72 sata nakon prijema u bolnicu. Izvanbolnički pacijenti bili su svi pacijenti, koji su na Zavod za Kliničku

mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, upućeni iz Ordinacija primarne zdravstvene zaštite s područja Brodsko-posavske županije. Pod pojmom izvanbakterijske infekcije podrazumijevaju se sve infekcije, koje su vidljive po prijemu u bolnicu ili unutar prvih 48-72 sati u bolnici (8).

Anonimnost ispitanika u ovom istraživanju osigurana je na način da su se za istraživanje koristili sljedeći podaci ispitanika: dob i spol te šifra za svakog ispitanika. Za provođenje predloženog istraživanja, dobivena je privola Etičkog povjerenstva Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije.

Ovo presječno istraživanje temelji se na prigodnom uzorku (engl. *convenience sample*), što podrazumijeva da su u istraživanje uključene sve osobe koje su voljne pristupiti istraživanju, a koje su se javile u Službu za Kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije (7).



### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Testiranje osjetljivosti na antibiotike (cefoksitin)

Identifikacija navedenih izolata temeljila se na morfološkim karakteristikama i korištenju standardnih biokemijskih testova. Nakon identifikacije sojeva, osjetljivost bakterija na antimikrobne lijekove odredila se metodom disk difuzije po Kirby Bauer-u na Mueller Hinton agaru na sljedeće antibiotike (Becton Dickinson, USA): gentamicin (10 $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), netilmicin (30  $\mu$ g), ciprofloksacin (5  $\mu$ g), norfloksacin (10  $\mu$ g), imipenem (10  $\mu$ g), meropenem (10  $\mu$ g), cefepim (30  $\mu$ g), ceftazidim (30  $\mu$ g), cefoperazon (75  $\mu$ g), piperacilin+tazobactam (100/10  $\mu$ g), piperacilin (100  $\mu$ g), cefoksitin (30  $\mu$ g), cefazolin (30  $\mu$ g), cefuroksim (30  $\mu$ g) i amoksicilin+klavulanska kiselina (20/10  $\mu$ g). U testiranju enterobakterija koristila se gustoća ispitivanog soja od 0,5 McFarlanda u sterilnoj fiziološkoj otopini određena denzitometrom.

Dobiveni rezultati su interpretirani prema nuputcima EUCAST-a za 2015.godinu. (9).

Za provedeno istraživanje je bitna zona inhibicije za cefoksitin, kako bi se odredilo jesu li bakterijski sojevi *K. pneumoniae* i *E. cloacae* rezistentni ili osjetljivi na cefoksitin. Prema EUCAST-ovim uputama za očitavanje zona inhibicije za enterobakterije, bakterijski soj se smatra osjetljivim na cefoksitin ukoliko je promjer zone inhibicije oko diska cefoksitina  $\geq 19$ mm, a rezistentnim ukoliko je promjer zone inhibicije  $< 19$ mm.

#### 3.3.2. Testiranje bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na produkciju ESBL

Produkcija ESBL utvrđena je metodom dvostrukog diska (engl. *double discsynergy test* - DDST). Probirni i potvrdni testovi za detekciju ESBL sojeva izvedeni su prema važećim standardima CLSI-a.

Izvođenje testa:

1. Na obični Mueller Hinton agar razmazati 0,5 McFarlanda ispitivanog soja
2. Na ploču postaviti diskove ceftazidim (CAZ30)-amoksicilin-klavulanska kiselina (AMC10)/10- ceftriakson (CRO30) na međusobnoj udaljenost od 20mm (od centra do centra diska).

3. Inkubirati na 35°C ( +/-2 °C) kroz 18 – 24 sata

Nakon maksimalno 24 h inkubacije očitavamo prisutnot sinergizma između diskova. Najmanji znak sinergizma smatramo pozitivnim testom tj. soj producira β-laktamaze proširenog spektra (ESBL).

U slučaju sužene zone oko CAZ30 i CRO30 diska (vidljivo iz primarnog antibiograma), potrebno je smanjiti udaljenost između diskova na 15 mm, dok je u slučaju velike zone inhibicije oko CAZ30 i CRO30 diska potrebno povećati udaljenost između diskova na 25mm.

### 3.3.3. Testiranje bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na produkciju AmpC β-laktamaza

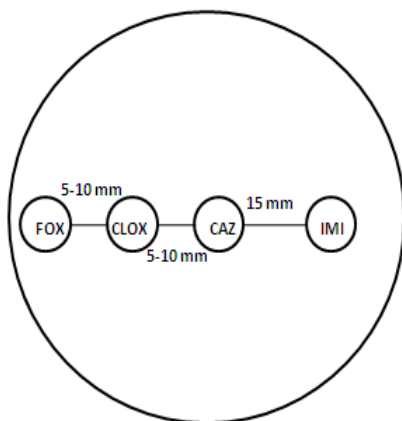
Produkcija AmpC β-laktamaza detektirala se Testom s kloksacilinskim diskom.

Izvođenje testa:

1. Na obični Mueller Hinton agar nanijeti ispitivani soj gustoće 0,5 McFarland-a
2. Na površinu agara pincetom nanijeti diskove po definiranom rasporedu (vidi shemu)
3. Udaljenost između diskova kloksacilin (CL500), cefoksitin (FOX30) i ceftazidim (CAZ30) (od ruba do ruba diska) je 5-10 mm\*
4. Udaljenosi između diskova ceftazidim (CAZ30) i imipenem (IMI10) (od ruba do ruba diska) je 15 mm
5. Inkubirati na +35°C (+/-2 °C) 18-24 sata

\*udaljenost ovisi o promjeru zona inhibicije za FOX30 i CAZ30

#### Shema postavljanja diskova na ploču



Očitavanje testa:

1. Nakon maksimalno 24h inkubacije očitavamo prisutnost sinergizma (fantomske zone) između diska CL500 i FOX30 i/ili CL500 i CAZ30.

Najmanji znak sinergizma očitavamo kao pozitivan test tj. soj producira AmpC-β-laktamazu

2. Između diskova CAZ30 i IMI10 gledamo pojavljivanje D-zone (inhibicije). Taj fenomen znači da je prisutna inducibilna AmpC-β-laktamaza (10).

### **3.3.4. Testiranje bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na produkciju karbapenemaza**

Produkciju karbapenemaza je često teško detektirati. Za screening test koristi se test osjetljivosti na sljedeće antibiotike: imipenem, ertapenem i meropenem.

Izvođenje testa:

1. Na obični MH agar nanijeti ispitivani soj gustoće 0,5 McFarland-a
2. Na površinu agara pincetom nanijeti diskove imipenema (IMI10), meropenema (MER10) i ertapenema (ERT10)
3. Inkubirati na +35°C (+/-2 °C) 18 – 24 sata

Očitavanje testa

Kod sojeva koje imaju smanjenu osjetljivost na imipenem, meropenem (zona inhibicije manja od 22mm) i ertapenem (zona inhibicije manja od 21mm) treba posumnjati na produkciju karbapenemaza (11).

### **3.4. Statističke metode**

Za opis distribucije frekvencija istraživanih varijabli upotrebljene su deskriptivne statističke metode. Sve varijable testirane su na normalnost distribucije Kolmogorov-Smirnovljevom testom te u ovisnosti o rezultatu za njihovu daljnju obradu primjenjene su parametrijske ili neparametrijske metode (12). Srednje vrijednosti kontinuiranih varijabli izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za normalno distribuirane varijable. Nominalni pokazatelji prikazani su raspodjelom učestalosti po skupinama i udjelom. Za utvrđivanje razlika među proporcijama između dva nezavisna uzorka korišten je  $\chi^2$ -test (12). Značajnost razlika utvrđenih statističkim testiranjem iskazana je na razini  $p < 0,05$ . U obradi podataka upotrjebljeni su izvorno pisani programi za baze podataka te statistički paket Statistica for Windows 2010 (inačica 10.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK).

## 4. Rezultati

### 4.1. Demografska obilježja ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo 100 ispitanika sa područja Brodsko-posavske županije, od kojih je 50 bolničkih pacijenata i 50 izvanbolničkih. Od 100 ispitanika, 63% (63/100) je bilo muškaraca, a 37% (37/100) žena. Prosječna dob muškaraca iznosila je  $56,3 \pm 18,3$ , dok je prosječna dob žena iznosila  $52,0 \pm 16,6$ . Prosječna dob svih ispitanika prema spolu prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Prosječna dob ispitanika prema spolu

Spol	N	Min	Max	$\bar{x}$	SD
Muški	63	19	88	56,3	18,3
Ženski	37	24	81	52,0	16,6

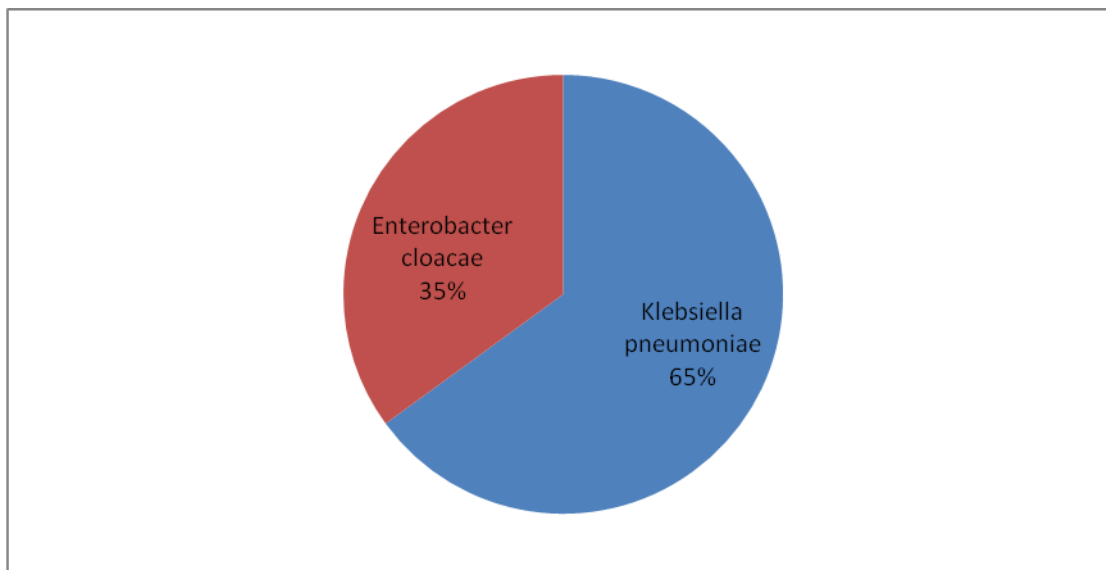
U Tablici 2. prikazana je prosječna dob ispitanika prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze. Prosječna dob bolničkih pacijenata je bila  $55,6 \pm 17,4$ . Najmlađi bolnički pacijent imao je 26 godina, a najstariji 88 godina. Prosječna dob izvanbolničkih pacijenata bila je  $53,8 \pm 18,1$ . Najmlađi izvanbolnički pacijent imao je 19, a najstariji 86 godina.

Tablica 2. Prosječna dob ispitanika prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze

Vrsta pacijenata	N	Min	Max	$\bar{x}$	SD
Bolnički	50	26	88	55,6	17,4
Izvanbolnički	50	19	86	53,8	18,1

#### 4.2. Učestalost odabranih bakterijskih sojeva izoliranih kod ispitanika

U uzorcima urina ispitanika detektirani su bakterijski sojevi *K. pneumoniae* i *E. cloacae*, od čega 65% (65/100) *K. pneumoniae* i 35% (35/100) *E. cloacae*, a njihova zastupljenost prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Zastupljenost bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* kod bolničkih i izvanbolničkih pacijenata

U Tablici 3. prikazana je raspodjela bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze. Kod bolničkih pacijenata detektirano je 56% (28/50) uzoraka sa sojem *K. pneumoniae*, a njih 44% (22/50) sa sojem *E. cloacae*. Kod izvanbolničkih pacijenata detektirano je 74% (37/50) uzoraka sa sojem *K. pneumoniae*, a njih 26% (13/50) sa sojem *E. cloacae*.

Tablica 3. Raspodjela bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze

Soj	Bolnički pacijenti	Izvanbolnički pacijenti	Ukupno
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>K. pneumoniae</i>	28 (56)	37 (74)	65 (65)
<i>E. cloacae</i>	22 (44)	13 (26)	35 (35)
Ukupno	50 (100)	50 (100)	100 (100)

#### 4.3. Učestalost i pokazatelji produkcije AmpC β-laktamaza

U Tablici 4. prikazana je osjetljivost bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na cefoksitin prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze. Gledajući uzorke svih ispitanika, 24% (24/100) bakterijskih sojeva je bilo osjetljivo na cefoksitin, dok je njih 76% (76/100) bilo rezistentno na cefoksitin. Rezistencija na cefoksitin bolničkih pacijenata bila je prisutna kod 86% (43/50) bakterijskih sojeva, dok je kod vanbolničkih pacijenata rezistencija na cefoksitin bila prisutna u 66% (33/50) bakterijskih sojeva.

Istraživanje je pokazalo kako je postojala statistički značajna razlika u osjetljivosti na cefoksitin između bolničkih te izvanbolničkih pacijenata ( $\chi^2=5,482$ ;  $df=1$ ;  $p=0,034$ ).

Tablica 4. Osjetljivost bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na cefoksitin prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze

CEFOKSITIN	BOLNIČKI PACIJENTI	IZVANBOLNIČKI PACIJENTI	UKUPNO N (100%)	p <sup>*</sup>
	N(%)	N(%)		
OSJETLJIV	7 (14%)	17 (34%)	24 (24%)	0,034
REZISTENTAN	43 (86%)	33 (66%)	76 (76%)	
UKUPNO	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)	

\*  $\chi^2$ -test

U Tablici 5. prikazana je zastupljenost ESBL producirajućih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze.

U ukupnom broju urina pronađeno je 40% (40/100) sojeva koji su proizvodili ESBL, dok je 60% (60/100) izoliranih sojeva bilo ESBL negativno. Kod bolničkih pacijenata bilo je 48% (24/50) ESBL pozitivnih bakterijskih sojeva, dok je kod izvanbolničkih pacijenata bilo 32% (16/50) ESBL pozitivnih bakterijskih sojeva. Od ukupnog broja sojeva *K. pneumoniae*, njih 46,2% (30/65) bilo je ESBL pozitivno, dok je od ukupnog broja *E. cloacae* njih 28,6% (10/35) bilo ESBL pozitivno.

Istraživanje je pokazalo kako nije postojala statistički značajna razlika u produkciji ESBL između bolničkih te izvanbolničkih pacijenata ( $\chi^2=2,667$ ;  $df=1$ ;  $p=0,153$ ).



Tablica 5. Zastupljenost ESBL producirajućih bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze

	Bolnički pacijenti	Izvanbolnički pacijenti	Ukupno	p*
	N (%)	N (%)	N (%)	
ESBL pozitivni sojevi	24 (48)	16 (32)	40 (40)	0,153
ESBL negativni sojevi	26 (52)	34 (68)	60 (60)	
Ukupno	50 (100)	50 (100)	100 (100)	

\* $\chi^2$ -test

U Tablici 6. prikazana je zastupljenost produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje pacijenti dolaze.

U ukupnom broju urina pronađeno je 65% (65/100) sojeva kod kojih je utvrđena prisutnost AmpC  $\beta$ -laktamaza. Prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje dolaze, kod 82% (41/50) izoliranih sojeva bolničkih pacijenata utvrđena je produkcija AmpC  $\beta$ -laktamaza, dok je kod 52% (26/50) izoliranih sojeva izvanbolničkih pacijenata utvrđena produkcija AmpC  $\beta$ -laktamaza.

Istraživanje je pokazalo kako je postojala statistički značajna razlika u produkciji AmpC  $\beta$ -laktamaza između bolničkih te izvanbolničkih pacijenata ( $\chi^2=9,890$ ;  $df=1$ ;  $p=0,003$ ).

Tablica 6. Zastupljenost produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza kod bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* prema vrsti zdravstvene ustanove iz koje pacijenti dolaze

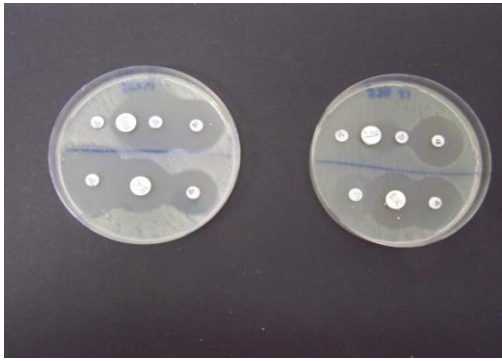
	Bolnički pacijenti	Izvanbolnički pacijenti	Ukupno	p*
	N (%)	N (%)	N (%)	
AmpC pozitivni sojevi	40 (80)	25 (50)	65 (65)	0,003
AmoC negativni sojevi	10 (20)	25 (50)	35 (35)	
Ukupno	50 (100)	50 (100)	100 (100)	

\* $\chi^2$ -test

Gledajući vrstu AmpC  $\beta$ -laktamaza kod svih bakterijskih sojeva, konstitutivna AmpC  $\beta$ -laktamaza bila je prisutna 35% (35/100) sojeva svih ispitanika, dok je inducibilna AmpC  $\beta$ -laktamaza bila prisutna kod 32% (32/100) bakterijskih sojeva iz uzoraka svih ispitanika.

Od ukupnog broja sojeva *E. cloacae*, kod njih 31,4% (11/35) detektirana je produkcija inducibilnih AmpC  $\beta$ -laktamaza, dok je kod *K. pneumoniae* kod 32,3% (21/65) detektirana produkcija inducibilnih AmpC  $\beta$ -laktamaza.

Na slici 2. prikazano je testiranje prisutnosti inducibilne AmpC  $\beta$ -laktamaze (diskovi na gornjoj polovici ploče) koja je kod testiranih sojeva bila pozitivna (stvaranje „fantomske zone“ oko kloksacilinskog diska)



Slika 2. Pozitivan test dokaza Inducibilne AmpC  $\beta$ -laktamaza

#### 4.4. Učestalost rezistencije na karbapeneme kod odabranih bakterijskih sojeva

U izoliranim sojevima nije dokazana rezistencija na karbapeneme, tj. prisutnost karbapenemaza.

## Rasprava

U istraživanju su obrađeni podaci dobiveni od 100 ispitanika (50 bolničkih i 50 izvanbolničkih) u koji su se javili u Službu za Kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije u Slavonskom Brodu.

U istraživanju su korišteni uzorci ispitanika u kojima su izolirani bakterijski sojevi *K. pneumoniae* i *E. cloacae*. Istraživanje je pokazalo kako je u 65% (65/100) uzoraka urina ispitanika uzročnik IMS *K. pneumoniae*, dok je u 35% (35/100) uzoraka uzročnik *E. cloacae*.

*E.coli* je još uvijek najčešći uzročnik IMS te su dobro osjetljive na antibiotike, iako je njihova rezistencija na  $\beta$ -laktamske antibiotike u porastu. Porast rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike (posebno na cefalosporine i karbapeneme) primjećen je i kod drugih enterobakterija (1,4). Udio ESBL sojeva je mnogo veći među izolatima *K. pneumoniae*, a u hrvatskim bolnicama kreće se između 20 i 40%. Dok je kod *K. pneumoniae* rezistencija prema cefalosporinima III.generacije uzrokovana proizvodnjom ESBL, kod *E. cloacae* ta je rezistencija uzrokovana hiperprodukcijom inducibilnih AmpC  $\beta$ -laktamaza. *K. pneumoniae* prirodno ne može proizvoditi inducibilne  $\beta$ -laktamaze, ali ih može steći preko plazmida, a takvi slučajevi su opisani i u Hrvatskoj (1).

Kako podaci o najučestalijim uzročnicima infekcija mokraćnog sustava u Hrvatskoj ukazuju na veliki udio infekcija uzrokovanih *K. pneumoniae* i *E. cloace* te o porastu rezistencije ovih bakterija na cefalosporine i karbapeneme, a u Hrvatskoj nedostaju istraživanja o vrstama rezistencije navedenih bakterijskih sojeva, ovo istraživanje bilo je usmjereno upravo na ove bakterijske sojeve.

Kao fenotipska potvrda za detekciju produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza Klinički i laboratorijski zavod za norme (CLSI) preporuča korištenje osjetljivosti na cefoksitin i cefotetan, kao i produkciju ESBL pa su u ovom istraživanju rezistencija na cefoksitin i ESBL produkcija korišteni kao prediktori AmpC rezistencije (13).

Istraživanje je pokazalo da je među sojevima svih ispitanika utvrđena rezistencija na cefoksitin u iznosu od 76% (76/100). Od toga, kod 86% (43/59) sojeva bolničkih pacijenata je utvrđena rezistencija na cefoksitin, dok je kod 66% (33/50) sojeva izvanbolničkih pacijenata

utvrđena rezistencija. Razlika bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloace* u rezistenciji na cefoksitin između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata u ovom istraživanju je bila statistički značajna.

U Europi se udio izolata *K. pneumoniae* s ESBL produkcijom kreće između <5% u Skandinaviji i Nizozemskoj i >50% u Grčkoj i Poljskoj. Njihov udio u Hrvatskoj među invazivnim izolatima iznosi oko 56%, dok je među bolničkim izolatima oko 34% (14).

Prema podacima dobivenim u istraživanju, ukupno 40% (40/100) sojeva je bilo ESBL pozitivno. Među sojevima *K. pneumoniae* bilo je 46,2% (30/65) sojeva ESBL pozitivno.

U istraživanju koje je provedeno na Tajvanu testirano je 116 bolničkih izolata *E. cloacae*. Ukupan udio ESBL sojeva među njima bio je 21,6%, a najveću osjetljivost za detekciju ESBL sojeva imao je DDST od visokih 96%, te specifičnost 69,2% (15). Ovom metodom i u provedenom istraživanju detektirala se prisutnost ESBL sojeva. Kod bolničkih pacijenata utvrđeno je 28,6% (10/35) sojeva *E. cloacae* koji produciraju ESBL. Razlika u produkciji ESBL među bakterijskim sojevima *K. pneumoniae* i *E. cloacae* kod bolničkih i izvanbolničkih pacijenata nije bila statistički značajna.

Istraživanje provedeno u Ujedinjenom Kraljevstvu 2004. godine obuhvatilo je sve uzorke u kojima su sojevi iz porodice *Enterobacteriaceae* bili rezistentni na cefalosporine, te je otkriveno da većinu ESBL pozitivnih sojeva čini *Escherichia coli*, dok je pet godina prije najviše ESBL pozitivnih sojeva bilo prisutno među rodovima *Klebsiella* i *Enterobacter* (16).

Kako za produkciju AmpC  $\beta$ -laktamaza ne postoje jasne smjernice, nego samo preporuke, njihova detekcija je dosta teška. Bakterije koje produciraju AmpC  $\beta$ -laktamaze ne moraju nužno biti otporne na cefalosporine proširenog spektra. Za sada nije potvrđen niti jedan test probiranja niti potvrde produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza pa se mora kombinirati nekoliko testova koji bi potvrdili prisutnost AmpC  $\beta$ -laktamaze. Ukoliko nisu dostupni nikakvi specifičniji i osjetljiviji testovi, otpornost na cefoksitin uz otpornost na cefalosporine proširenog spektra i očuvanu osjetljivost na cefepim upućuje na prisutnost AmpC  $\beta$ -laktamaza (17).

U istraživanju je fenotipskim testovima za detekciju produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza utvrđeno da je ukupno 65% onih kod kojih je utvrđena prisutnost AmpC  $\beta$ -laktamaza, od kojih je 35% (35/100) sojeva s konstitutivnom AmpC  $\beta$ -laktamazom, dok je kod 32% (32/100) sojeva iz uzoraka ispitanika bila prisutna inducibilna AmpC  $\beta$ -laktamaza. S obzirom da sojevi *E. cloacae* prirodno proizvode inducibilne  $\beta$ -laktamaze, bitno je napomenuti da je u provedenom istraživanju kod 31,4% (11/35) sojeva detektirana produkcija inducibilnih AmpC  $\beta$ -laktamaza.

Gledajući na ukupnu produkciju AmpC  $\beta$ -laktamaza, utvrđeno je da je ona češća kod bolničkih pacijenata te da je razlika u produkciji AmpC  $\beta$ -laktamaza između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata statistički značajna.

Prema podacima Akademije medicinskih znanosti Hrvatske, od 2010.godine zamijećen je stalan porast produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza kod *K. pneumoniae*. Podaci i uzorci se prikupljaju svake godine u razdoblju od 01.10.-31.12. na području cijele Hrvatske, te je 2010. godine detektirano 9 sojeva *K. pneumoniae* koji produciraju AmpC, dok je 2013.godine detektirano njih 11. S obzirom da se radi o prikupljanju uzoraka tijekom samo dva mjeseca godišnje, pretpostavka je da je ukupan broj sojeva *K. pneumoniae* koje produciraju AmpC za cijelu godinu puno veći (18).

U presječnom istraživanju provedenom od kolovoza do prosinca 2013.godine u Teheranu, iz različitih kliničkih uzoraka, uključujući i uzorke urina, obuhvaćeno je ukupno 303 uzorka *K. pneumoniae*, od čega 17% (52/303) bolničkih i 83% (251/303) izvanbolničkih. Fenotipizacijom je otkriveno je 3,6% (11/303) sojeva *K. pneumoniae* s AmpC produkcijom, dok je metodom genotipizacije (PCR-om) otkriveno njih 0,09% (3/303) (19).

Niti jedan nije test nije u potpunosti specifičan, a rezultati koji se dobiju njihovom kombinacijom su ovisni o vrsti bakterije ili testirane  $\beta$ -laktamaze. Neovisno o izboru metode probiranja, još uvijek nedostaju validni testovi za detekciju AmpC  $\beta$ -laktamaza (17).

U provedenom istraživanju nije pronađen niti jedan soj koji producira karbapenemaze.

U istraživanju koje je provedeno u Srbiji, u Kliničkom centru Srbije, u razdoblju od studenog 2011. godine do siječnja 2012. godine, izolirano je 172 uzoraka *Enterobacteriaceae*. Daljnim testiranjima je primjećeno da 37.2% (54/145) sojeva pokazuje smanjenu osjetljivost na  $\beta$ -laktamske antibiotike. Uz to, primjećeno je da je 2,8% (4/145) sojeva produciralo karbapenemaze, od toga 75% sojeva *K. pneumoniae* (20).

U Hrvatskoj se već više od deset godina sojevi smanjene osjetljivosti na karbapeneme šalju u Referentni centar za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike. Do 2011. godine su enterobakterije koje proizvode karbapenemaze bile izrazito rijetke u Hrvatskoj. U veljači 2011. godine se pojavio prvi soj KPC *K.pneumoniae*, dok je 2012. godine otkriveno 19 sojeva koji produciraju karbapenemaze. Godine 2013. je u Referentni centar pristiglo 256 izolata koji su imali smanjenu osjetljivost ili su bili otporni na karbapeneme. Kod njih 95 je dokazana produkcija karbapenemaza, odnosno, tijekom 2013.godine u Hrvatskoj je rezistencija enterobakterija na karbapeneme iznosila 37,1%. Od toga je 46,3% (44/95) izolata *K. pneumoniae*, a 44,2% (42/95) *Enterobacter spp.* (18)

S obzirom da je sve češća izolacija bakterija koje produciraju karbapenemaze, a karbapenemi predstavljaju antibiotike koji su zadnja linija liječenja, potrebno je posvetiti pažnju ovom problemu te s oprezom postupiti kod sumnje na produkciju karbapenemaza kako bi se ona i potvrdila te kako bi se na vrijeme pomoglo pacijentu s infekcijom uzrokovanom bakterijom koja proizvodi karbapenemaze.

U samom postupku ovog istraživanja postoje određena ograničenja. Prije svega, kao ograničenje je potrebno istaknuti veličinu uzorka koji je obuhvaćen. Osim toga, ograničenje je i u statističkim metodama, kao i osjetljivosti i specifičnosti primjenjenih fenotipskih metoda koji se većinom ne koriste u rutinskom radu. Kako bi se dobili precizniji rezultati u testiranju bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na rezistenciju na  $\beta$ -laktamske antibiotike, potrebno je koristiti sofisticiranije metode, a prije svega genotipizaciju.

Uz to, kako se radi o presječnom istraživanju, ne mogu se izvoditi zaključci o uzročno posljedičnoj povezanosti.

Ovo istraživanje bi se moglo unaprijediti kada bi se proširilo i obuhvatilo veći broj uzoraka ispitanika i kroz dulje vremensko razdoblje te bi moglo poslužiti kao jedno od početnih istraživanja na ovu temu i kao baza podataka, s obzirom na činjenicu da nema puno istraživanja koji se bave ovom tematikom u Hrvatskoj.

Osmišljavanjem te provođenjem ovakvog istraživanja na području cijele Hrvatske kroz cijelu godinu, dobili bi se točni podaci o veličini i značajkama ovog važnog javnozdravstvenog problema u svijetu, a tako i u Hrvatskoj. Rezultati bi mogli poslužiti kao temelj za provođenje specifičnih javnozdravstvenih intervencija u svrhu sprječavanja rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike te na taj način i očuvanja i unaprjeđenja zdravlja stanovnika u Republici Hrvatskoj, a posebno onih koji su izloženi većem riziku za IMS ispitivanim sojevima zbog brojnih rizičnih čimbenika.



## 5. Zaključak

Temeljem ovog istraživanja moguće je izvesti sljedeće zaključke:

1. Učestalost rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike je u stalnom porastu u Hrvatskoj pa tako i u Brodsko-posavskoj županiji. Double disk metodom na području Brodsko-posavske županije je utvrđena visoka učestalost rezistencije bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na cefoksitin u iznosu od 76%. Fenotipizacijom je utvrđena visoka učestalost produkcije ESBL u iznosu od 40%, kao i produkcije AmpC  $\beta$ -laktamaza u iznosu od 65% na području Brodsko-posavske županije. Produkcija karbapenemaza kod bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na području Brodsko-posavske županije nije utvrđena.
2. Među bolničkim i izvanbolničkim pacijentima postojala je statistički značajna razlika u rezistenciji na cefoksitin i produkciji AmpC  $\beta$ -laktamaza.

## 6. Sažetak

**Pozadina istraživanja:** Sojevi *K. pneumoniae* i *E. cloacae* pokazuju različite vrste rezistencije  $\beta$ -laktamske antibiotike

### Ciljevi istraživanja:

1. utvrditi učestalost različitih vrsta rezistencije bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na  $\beta$ -laktamske antibiotike u uzrocima urina pacijenata s područja Brodsko-posavske županije pomoću disk difuzije, određivanjem MIK-a ili uz pomoć fenotipizacije
2. procijeniti postoji li razlika u učestalosti pojave rezistencije između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata.

**Nacrt studije:** Presječna studija.

**Ispitanci i metode:** U istraživanju je mikrobiološki obrađeno 100 uzoraka urina bolničkih i izvanbolničkih pacijenata koji su se javili u Službu za Kliničku mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije u Slavonskom Brodu. U uzorcima su detektirani bakterijski sojevi *K. pneumoniae* ili *E. cloacae*. Svi uzorci su testirani na rezistenciju na cefoskitin metodom disk difuzije te Double disk testom na produkciju ESBL, dok se fenotipizacijom detektirala produkcija AmpC  $\beta$ -laktamaza i karbapenemaza.

**Rezultati:** Dobiveni rezultati pokazuju da je među bakterijskim sojevima *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* prisutna visoka učestalost rezistencije na cefoksitin, kao i produkcija ESBL i AmpC  $\beta$ -laktamaza. U istraživanju nije utvrđena produkcija karbapenemaza.

**Zaključak:** U svijetu pa tako i u Hrvatskoj, zabilježen je porast rezistencije bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae* na  $\beta$ -laktamske antibiotike. Pri tom je porast rezistencije utvrđen i u Brodsko-posavskoj županiji. Među navedenim sojevima otkrivena je visoka rezistencija na cefoksitin, visoka učestalost produkcije ESBL i AmpC  $\beta$ -laktamaza, dok nije utvrđena produkcija karbapenemaza. Otkriveno je da između bolničkih i izvanbolničkih pacijenata postoji statistički značajna razlika u rezistenciji na cefoksitin i u produkciji AmpC  $\beta$ -laktamaza kod bakterijskih sojeva *K. pneumoniae* i *E. cloacae*.

**Ključne riječi:**  $\beta$ -laktamski antibiotici; *Enterobacter cloacae*; *Klebsiella pneumoniae*;  
rezistencija

## 7. Summary

*The resistance of bacterial strains of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae isolated from urine samples to  $\beta$ -lactam antibiotics*

**Research background:** Strains of *K. pneumoniae* and *E. cloacae* show different types of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics

**Research objectives:**

1. to determine the frequency of different types of resistance of bacterial strains *K. pneumoniae* and *E. cloacae* to  $\beta$ -lactam antibiotics in the urine samples of the patients from the area of Brod-Posavina County by disk diffusion, determining of MIC or with the help of phenotyping
2. to assess whether there is a difference in the frequency of resistance among hospital patients and outpatients.

**Study Plan:** A cross-sectional study.

**Examinees and methods:** In this study, 100 urine samples of hospital patients and outpatients, who applied to the Department for clinical microbiology of the Institute of Public Health of Brod-Posavina County in Slavonski Brod, were microbiologically processed. Bacterial strains of *K. pneumoniae* or *E. cloacae* were detected in the samples. All samples were tested for resistance to cefoxitin by disc diffusion method and by Double disk test for ESBL production, while production of AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases was detected by phenotyping.

**Results:** The results show that among the bacterial strains *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*, a high frequency of resistance to cefoxitin, as well as the production of ESBLs and AmpC  $\beta$ -lactamase is present. The production of carbapenemases has not been determined.

**Conclusion:** Worldwide, including Croatia, there is increasing resistance to bacterial strains of *K. pneumoniae* and *E. cloacae* to  $\beta$ -lactam antibiotics. Thereby, the increase in resistance was also registered in Brod-Posavina County. Among these strains, a high resistance to

cefoxitin, high frequency of ESBL and AmpC  $\beta$ -lactamases production was detected, while the production of carbapenemases has not been determined. It was found that there is statistically significant difference in resistance to cefoxitin and in production of AmpC  $\beta$ -lactamases in bacterial strains of *K. pneumoniae* and *E. cloacae* between hospital patients and outpatients.

**Keywords:**  $\beta$ -lactam antibiotics; *Enterobacter cloacae*; *Klebsiella pneumoniae*; resistance

## 8. Literatura

1. Andrašević S, Tambić Andrašević A. Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus*. 2006; 15(2):245-250
2. Andrašević S, Vranić-Ladavac M, Pristaš I, Škerk V. Uzročnici infekcija mokraćnog sustava i njihova osjetljivost na antibiotike. *Infektološki glasnik*. 2009;29(4):165-170.
3. Piljić D, Ahmetagić S, Piljić D, Stojić V, Petrović J. Antimikrobna rezistencija uzročnika izvanbolničkih infekcija mokraćnog sustava u odraslih bolesnika hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti Tuzla. *Infektološki glasnik*. 2009; 29(1):25-28.
4. Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija*. Medicinska naklada: Zagreb; 2013.
5. Kalenić S. Rezistencija bakterije na antibiotike. *Medicus*. 2000; 9(2):149-153
6. Tambić Andrašević A, Jelić M, Butić I, Bukovski S. Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. *Infektološki glasnik*. 2012; 32(2):45-52.
7. Kolčić I, Vorko-Jović A. *Epidemiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012
8. Livermore MD, Paterson LD. *Pocket Guide to  $\beta$ -Lactamases in Resistance*. London: Current Medicine Group Ltd; 2007.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.  
<http://www.eucast.org>. Datum pristupa 20.08.2015.godine

10. Privatni radni protokoli Referentnog centra za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike, svibanj 2015.godine
11. Mechanism of resistance-rosco.dt. Dostupno na: [http://www.rosco.dk/pdf/Screening\\_and\\_detection\\_of\\_carbapenemases\\_version\\_C.pdf](http://www.rosco.dk/pdf/Screening_and_detection_of_carbapenemases_version_C.pdf)  
Datum pristupa 27.08.2015.godine
12. Petrie A, Sabin C. Medical Statistics at a Glance. London: Blackwell Science Ltd; 2000.
13. Polsfuss S, Gloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Practical Approach for Reliable Detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011; 49(8):2798-2803.
14. Tambić Andrašević A. Etiologija urogenitalnih infekcija. Medicus. 2012;21(1):15-21
15. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009; 42(4):310-6
16. Livermore DM, Pillay D. Antimicrobial Resistance: Inevitable but not Unmanageable. London: HPA, 2005
17. Erdeljić V. Utjecaj primjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spectra (AmpC i ESBL) i ishod liječenja bolesnika. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2012
18. Tambić Andrašević A, Tambić T, Katalinić-Janković V, Payerl-Pal M, Bukovski S, Butić I, Šoprek S. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj 2013.godine. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, 2014

19. Azimi L, Eraliyan G, Talebi M, Owilia P, Bina M, Lari A R, i sur. Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC among Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Different Hospitals in Tehran. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(4): DC01-DC03
  
20. Cirković I, Pavlović L, Konstatinović N, Kostić K, Jovanović S, Djukić S. Phenotypic detection of beta-lactamases production in Enterobacteriaceae. *Srp Arh Celok Lek.* 2014;142(7-8):457-63.



## 9. Životopis

Opći podaci:

- Ime i prezime: Marina Dujmić Ilić
- Datum i mjesto rođenja: 27.05.1988.godine u Slavonskom Brodu
- Adresa stanovanja: Naselje Čaplja II/3, Slavonski Brod
- Telefon: +385 (91) 5902891
- E-mail: [marina.dujmic@gmail.com](mailto:marina.dujmic@gmail.com)

Obrazovanje:

- Medicinski fakultet u Osijeku, sveučilišni diplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, 2013.-2015.
- Pravni fakultet Zagreb, sveučilišni diplomski studij socijalne politike, 2014.-
- Medicinski fakultet Rijeka, stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, 2009.-2012.
- Pravni fakultet Zagreb, sveučilišni preddiplomski studij socijalnog rada, 2007.-2014.
- Srednja škola Gimnazija „Matija Mesić“, smjer: prirodoslovno matematički, 2003.-2007.
- Osnovna škola „Blaž Tadijanović“ u Podvinju, 1995.-2003.

Radno iskustvo:

- Osnovna škola „Milan Amruš“ Slavonski Brod, asistent u nastavi za djecu s posebnim potrebama, 01.12.2014.-16.06.-2015.
- Opća bolnica „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod, stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa, 20.05.2013.-19.05.2014.

Posebna znanja i vještine:

- Znanje svjetskih jezika: engleski (aktivno), njemački (pasivno)
- Poznavanje rada na računalu: Word, Excel, Power Point, Internet
- Položen vozački ispit B kategorije

- Položen Stručni ispit pri Ministarstvu zdravlja za obavljanje poslova iz područja Medicinsko laboratorijske dijagnostike za Prvostupnika medicinsko laboratorijske dijagnostike