

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne
bioznanosti

Amir Ibrahimagić

**Epidemiologija infekcija uzrokovanih gram-negativnim
bakterijama koje produciraju β -laktamaze proširenog spektra,
plazmidne AmpC β -laktamaze i karbapenemaze u bolničkih i
vanbolničkih pacijenata**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne
bioznanosti

Amir Ibrahimagić

**Epidemiologija infekcija uzrokovanih gram-negativnim
bakterijama koje produciraju β -laktamaze proširenog spektra,
plazmidne AmpC β -laktamaze i karbapenemaze u bolničkih i
vanbolničkih pacijenata**

Doktorska disertacija predložena

Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije

radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti

Zagreb, 2014.

Doktorska disertacija je izrađena u Službi za mikrobiologiju, Kantonalne bolnice Zenica, u Službi za Laboratorijsku dijagnostiku, Zavoda za javno zdravstvo Zeničko – Dobojskog kantona, te u Laboratoriju Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Kliničkog bolničkog centra, Rebro, Zagreb.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti
Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
(Područje prirodnih znanosti i Područje biomedicine i zdravstva)
Znanstveno polje: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

Doktorska disertacija

Epidemiologija infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama koje produciraju β -laktamaze proširenog spektra, plazmidne AmpC β -laktamaze i karbapenemaze u bolničkim i vanbolničkim pacijenata

Amir Ibrahimagić

Rad je izrađen u: J. U. Kantonalnoj bolnici Zenica
J. U. Zavoda za javno zdravstvo Zeničko-Dobojskog kantona
Kliničkom bolničkom centru Rebro, Klinički zavod za kliničku i
molekularnu mikrobiologiju
Mentor/i: Prof. dr. sc. Selma Uzunović, mentor 1
Prof. dr. sc. Branka Bedenić, mentor 2

Kratki sažetak doktorskog rada:

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) su enzimi otkriveni u kasnim 1970-tim i ranim 1980-tim godinama među gram-negativnim bakterijama. Cilj istraživanja je ustanoviti prevalenciju ESBL u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, prevalenciju prema dobi i spolu, te prevalenciju ESBL, plazmidnih AmpC beta-laktamaza, te karbapenemaza. ESBL-producirajući izolati su izolovani u 144 bolnička i izvanbolnička uzorka. ESBL-producirajući izolati su većim dijelom porijekla iz mokraće i briseva kirurških rana. U bolničkoj sredini dominantna je ESBL-producirajuća *Klebsiella* spp., dok je u izvanbolničkoj sredini preovladavala ESBL-producirajuća *E. coli*. Prema rezultatima, cefuroksim, cefotaksim i ceftazidim su lijekovi koji se ne preporučuju u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama, sa $\text{MIK}_{90} \geq 256$ mg/L. Ovo je prvi izvještaj o detekciji *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-28}, *bla*_{CMY-2} i *bla*_{DHA-1} na prostorima Bosne i Hercegovine.

Broj stranica: 221

Broj slika: 9

Broj tablica: 31

Broj literaturnih navoda: 307

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ESBL, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{OXA-51}, genotipizacija, antimikrobna osjetljivost

Datum obrane: 23. 05. 2014.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jasmina Vraneš, redovita profesorica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu- predsjednica
2. prof. dr. sc. Selma Uzunović, načelnica Službe za laboratorijsku dijagnostiku Zavoda za javno zdravstvo Zeničko-Dobojskog kantona, mentor 1
3. prof. dr. sc. Branka Bedenić, redovita profesorica Medicinskog fakulteta Sveučilište u Zagrebu, mentor 2 i član
4. doc. dr. sc. Domagoj Drenjančević, docent Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
5. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član
6. dr. sc. Davor Zahradka, viši znanstveni suradnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, zamjena člana

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences
Scientific Area: Interdisciplinary field of science
(Natural sciences and Biomedicine and Health)
Scientific Field: Biology and Basic medical sciences

PhD thesis

Epidemiology of infections caused Gram-negative bacteria producing extended-spectrum beta-lactamases, plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and carbapenemase in hospital and community settings

Amir Ibrahimagić

Thesis performed at: Cantonal hospital of Zenica
Cantonal Public Health Institute of Zenica-Doboj Canton
Clinical hospital center of Zagreb, Rebro, Department of Medical
Microbiology, Zagreb, Croatia
Supervisor/s: Selma Uzunović, PhD, MD
Branka Bedenić, PhD, MD

Short abstract:

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are enzymes that have been discovered in the late 1970s and early 1980s among gram-negative bacteria. The aim of this research is to establish prevalence of ESBL in hospital and outside environment, prevalence according to the age and sex, as well as prevalence of ESBL in individual hospital wards. It also includes prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and carbapenemases. ESBL was detected in 144 in- and outpatient samples, respectively. Both in- and outpatient ESBLs were mostly isolated from urine and surgical wounds. ESBL prevalence was highest in an inpatient *Klebsiella* spp. and in outpatient *Escherichia coli* isolates. Cefuroxime, ceftazidime and cefotaxime were the least potent antibiotics with MIC₉₀ of ≥ 256 mg/L. The CTX-M-15 was most prevalent β -lactamases in the in- and outpatient settings. This is the first report of *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-28}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{DHA-1} detected with the PCR from ESBL-producing isolates in Bosnia and Herzegovina.

Number of pages: 221

Number of figures: 9

Number of tables: 31

Number of references: 307

Original in: croatian

Key words: ESBL, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{OXA-51}, genotyping, antimicrobial resistance

Date of the thesis defense: 05/23/2014

Reviewers:

1. Jasmina Vraneš, PhD, MD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Zagreb; president
2. Selma Uzunović, PhD, MD, Head of Department for Laboratory Diagnostics, Institute of Public Health Zenica-Doboj Canton, mentor 1 and member,
3. Branka Bedenić, PhD, MD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Zagreb, mentor 2 and member,
4. Domagoj Drenjančević, PhD, MD, Assistant Professor, Faculty of Medicine, Josipa Juraj Strossmayer University of Osijek, member
5. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek - member
6. Davor Zahradka, PhD, Senior Research Associate, Ruđer Bošković Institute - substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatskebratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Z a h v a l a

Od srca zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Selmi Uzunović i ko-mentorici prof. dr. sc. Branki Bedenić na strpljenju, mudrim savjetima, uloženom trudu, utrošenom vremenu i nesebičnoj pomoći pri izradi i pisanju ovog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Službe za mikrobiologiju J.U. Kantonalne bolnice Zenica.

Zahvaljujem svim djelatnicima Službe za laboratorijsku dijagnostiku, Zavoda za javno zdravstvo Zeničko-Dobojskog kantona, kao i ostalim članovima kolektiva zavoda.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb.

Zahvaljujem se obitelji, osobito roditeljima i braći na strpljenju, podršci i ljubavi.

Zahvaljujem svojim bliskim prijateljima na ohrabrivanju i moralnoj podršci u izradi doktorske disertacije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Beta-laktamaze: Definicija	2
1.2. Vrste beta-laktamaza	3
1.3. Historijat nastanka beta-laktamaza	4
1.4. Klasifikacija beta-laktamaza	5
1.4.1. Funkcionalne klasifikacije beta-laktamaza	5
1.5. Beta (β)-laktamaze proširenog spektra djelovanja (ESBL)	10
1.5.1. Tipovi beta-laktamaza proširenog spektra	11
1.5.1.1. TEM β -laktamaze	12
1.5.1.2. SHV-1 beta-laktamaze	13
1.5.1.3. CTX-M beta-laktamaze	13
1.5.1.4. OXA beta-laktamaze	14
1.5.1.5. Ostale beta-laktamaze	15
1.5.1.6. AmpC beta-laktamaze	15
1.5.1.7. Karbapenemaze	16
1.5.1.7.1. Klasa A karbapenemaza	16
1.5.1.7.2. Klasa B karbapenemaza	17
1.5.1.7.3. Klasa D karbapenemaza	18
1.6. Epidemiologija infekcija uzrokovanih sa gram-negativnim bakterijama koje produciraju ESBL	18
1.6.1. Geografska rasprostranjenost ESBL	18
1.6.2. Molekularna epidemiologija infekcija uzrokovanih sa ESBL-producirajućim izolatima	21
1.6.3. Rezervoari ESBL	26
1.6.4. Prevalencija ESBL infekcija	27
1.6.5. Dobna i spolna prevalencija ESBL	28
1.6.6. Prevalencija ESBL u različitim vrsta gram-negativnih bakterija	29
1.6.7. Prevalencija ESBL u bolničkoj i vanbolničkoj sredini	30
1.6.8. Prevalencija ESBL-producirajućih izolata u različitim kliničkim uzorcima	31
1.6.9. Prevalencija različitih tipova ESBL	31
1.7. Čimbenici rizika za nastanak infekcija sa ESBL-producirajućim izolatima	33
1.8. Liječenje infekcija uzrokovanih sa ESBL	35
1.9. Laboratorijska detekcija ESBL	39
1.9.1. Metoda dvostrukog diska (DDST)	40
1.9.1.1. Disk-difuzijski test sa inhibitorom za detekciju ESBL i AmpC beta-laktamaza	41
1.9.1.2. Trodimenzionalni test	41
1.9.1.3. Epsilon (E) test	41
1.9.1.4. Metode detekcije AmpC beta-laktamaza	42

1.9.2.	Molekularni testovi za detekciju ESBL	42
1.9.2.1.	Oligotipizacija	43
1.9.2.2.	Lančana reakcija polimeraze (PCR)	43
1.9.2.3.	Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimeraze (PCR-RFLP)	43
1.9.2.4.	Analiza konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA nakon lančane reakcije polimeraze (PCR-SSCP) ..	43
1.9.3.	Uloga mikrobioloških laboratorija u detekciji ESBL-producirajućih izolata	44
2.	HIPOTEZA	47
3.	CILJEVI RADA	47
4.	MATERIJAL I METODE	48
4.1.	Definicija (tip) istraživanja, ispitanici	48
4.2.	Vrijeme istraživanja	48
4.3.	Mikrobiološke metode	49
4.3.1.	Određivanje osjetljivosti/otpornosti na antimikrobne lijekove	49
4.3.2.	Disk-difuzijski test	49
4.3.3.	Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija	50
4.3.3.1.	Bujonska dilucijska metoda	51
4.3.3.1.1.	Pripremanje razrijeđenja antibiotika	51
4.3.3.1.2.	Pripremanje inokuluma	52
4.3.3.1.3.	Interpretacija rezultata	53
4.3.4.	Testovi za dokazivanje produkcije beta-laktamaza proširenog spektra (ESBL)	53
4.3.4.1.	Dvostruki disk-sinergistički test	54
4.3.4.2.	Disk na disk test	54
4.3.4.3.	Inhibitorom potencirani disk-difuzijski test	55
4.3.4.4.	E- test-ESBL	55
4.3.5.	Detekcija <i>bla</i> _{ESBL} gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR)	55
4.3.6.	Elektroforeza u pulzirajućem polju (PFGE)	58
4.3.6.1.	Izolacija i uzgoj bakterijskog soja za PFGE	58
4.3.6.2.	Uklapanje bakterija u agarozu	59
4.3.6.3.	Cijepanje kromosomske DNA pomoću restrikcijske endonukleaze <i>Xba</i> I	59
4.3.6.4.	Odjeljivanje pocijepanih dijelova kromosomske DNA pomoću EPP	60
4.3.6.5.	Dokumentiranje i interpretiranje rezultata	60
4.4.	Statističke metode	60
5.	REZULTATI	62
5.1.	Prvi dio istraživanja	62
5.2.	Drugi dio istraživanja	101

5.2.1.	Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata <i>Escherichia coli</i>	101
5.2.2.	Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata <i>E. coli</i>	104
5.2.3.	Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata <i>E. coli</i>	106
5.2.4.	Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata <i>Klebsiella</i> spp.	107
5.2.5.	Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata <i>Klebsiella</i> spp.	110
5.2.6.	Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata <i>Klebsiella</i> spp.	112
5.2.7.	Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata <i>Enterobacter cloacae</i>	114
5.2.8.	Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata <i>E. cloacae</i>	117
5.2.9.	Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata <i>E. cloacae</i>	119
5.2.10.	Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata <i>Proteus</i> spp.	120
5.2.11.	Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata <i>Proteus</i> spp.	123
5.2.12.	Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata <i>Proteus</i> spp.	125
5.2.13.	Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata <i>Acinetobacter</i> spp.	126
5.2.14.	Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata <i>Acinetobacter</i> spp.	129
5.2.15.	Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata <i>Acinetobacter</i> spp.	131
6.	RASPRAVA	132
6.1.	Prvi dio rasprave – retrospektivni	132
6.1.1.	Prevalencija ESBL-producirajućih izolata	132
6.1.2.	Prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u različitim vrstama kliničkog materijala	135
6.1.3.	Dobna prevalencija i incidencija	137
6.1.4.	Spolna prevalencija	138
6.1.5.	Čimbenici rizika za širenje ESBL-producirajućih izolata	140
6.1.6.	Prevalencija ESBL ovisno o vrsti uzročnika	144
6.1.7.	Antimikrobna otpornost ESBL-producirajućih izolata	145
6.2.	Drugi dio rasprave – prospektivni	148
6.2.1.	Prevalencija otpornosti na antimikrobne lijekove	148
6.2.2.	Prevalencija tipova beta-laktamaza kod <i>E. coli</i> u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini	150

6.2.3. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata <i>Klebsiella</i> spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini	153
6.2.4. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata <i>E. cloacae</i> u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini	155
6.2.5. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata <i>Proteus</i> spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini	157
6.2.6. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata <i>Acinetobacter</i> spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini	158
7. ZAKLJUČCI	161
8. LITERATURA	164
9. SAŽETAK	210
10. SUMMARY	212
11. Pregled korištenih simbola i oznaka	214
12. Biografija	216

1. UVOD

Beta laktamski antibiotici se uobičajeno koriste za liječenje bakterijskih infekcija. U ovu grupu antibiotika spadaju penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami (1). Beta laktamaze proširenog spektra djelovanja (engl. extended spectrum beta-lactamases, ESBL) su enzimi koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika, pri čemu poništavaju dejstvo antibiotika u terapiji. Postoje mnoga izvješća o ovim enzimima izolovanim u bakterijskim rodovima porodice Enterobacteriaceae, kao i roda *Pseudomonas* (2). Međutim, ESBL su najučestalije izolirane u bakterija *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (3). ESBL su prvo izolirane u izolatima iz bolničkih infekcija, no danas i u vanbolničkim infekcijama (4).

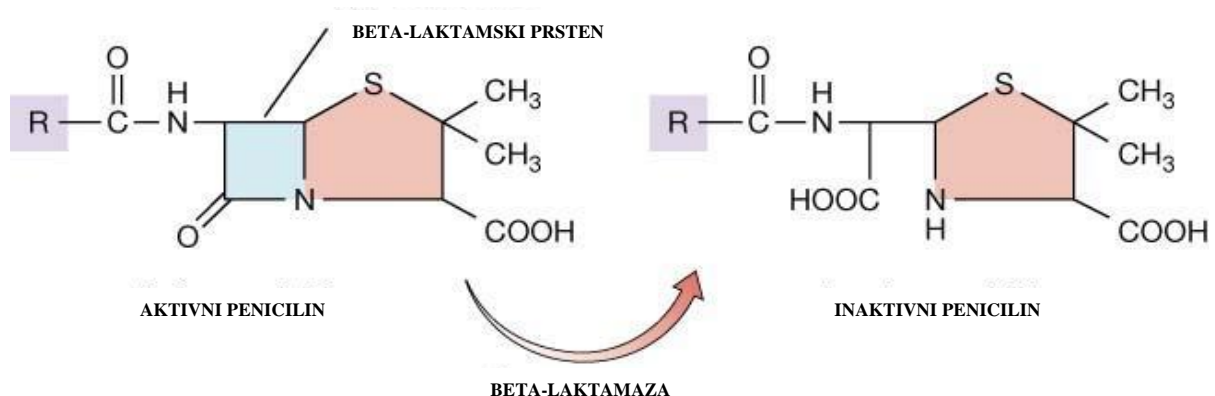
Prva plazmidom kodirana beta-laktamaza TEM-1, izolovana je 1960-ih godina iz bakterije *E. coli* (5). *In vitro*, ESBLs su inhibirane sa inhibitorima beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam. Neke ESBL su derivati ranije otkrivenih beta-laktamaza širokog spektra, kao što su TEM-1, TEM-2, SHV-1 i OXA-1-4, a razlikuju se od parentalnih enzima u točkastim mutacijama *bla* gena (6). Druge porodice ESBLs, kao što su CTX-M su native ESBL i postale su sve učestalije u vanbolničkoj sredini (6).

Postoje mnogobrojna izvješća o ESBL iz cijelog svijeta. Prevalencija ESBLs se kreće od 10-40% kod *K. pneumoniae* i oko 4% u *E. coli*. (7). Prevalencija ESBLs u Europi je veća u odnosu na SAD, ali niža u odnosu na azijske i sjeverno američke države (8). U periodu od 2009. do 2011. godine prevalencija zastupljenosti ESBLs kod *E. coli* u Pakistanu, Iraku, Iranu i Indiji se kretala od 43-96%, a kod *Klebsiella* spp. 60% (9, 10, 11, 12). U 2004. godini prevalencija ESBLs u Bangladešu kod *E. coli* i *K. pneumoniae* iznosila je 43,2% odnosno 39,5% (13), a 2010. iznosila je 31,5% kod izolata *Pseudomonas* spp., 47,8% u *E. coli*, 50,0% u *Proteus* spp. i 57,9% kod izolata *Klebsiella* spp (14). U Francuskoj su 2002. godine izolirane CTX-M-1, CTX-M-3 i CTX-M-14 beta-laktamaze (15). U 2010. godini

zastupljenost SHV, CTX-M, TEM i PER u Iranu iznosila je 26%, 24,5%, 18% odnosno 7,5% (11). U Indiji je 2006. godine zabilježena prevalencija CTX-M-15 beta-laktamaza od 73% kod *E. coli* i 72% kod *Klebsiella* spp., te 2010. godine prevalencija TEM i SHV beta-laktamaza iznosila je 30% i 38% (12, 16). U Indiji je 2011. godine zabilježena prevalencija TEM i CTX-M beta-laktamaza znatno viša kod *E.coli* (39,2%) u odnosu na *Klebsiella* spp., a sveukupna prevalencija za TEM, CTX-M i SHV iznosila je 42,6% (17).

1.1. Beta-laktamaze: Definicija

Beta-laktamaze proširenog spektra su enzimi koji se jako brzo razvijaju sa sposobnošću hidrolize i prouzrokovanja rezistencije na oksiminocefalosporine (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson, cefuroksim i cefepim), na monobaktame (aztreonam), ali ne i na cefamicine (cefoksitin i cefotetan) ili na karbapeneme (imipenem, meropenem i eritapenem) kod Gram negativnih bakterija, osobito kod *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* (7, 18, 19). Ovi enzimi se vežu na ciljno mjesto djelovanja penicilina (engl., protein binding protein, PBP), sa kojima čine homolognu sekvencu i dovode do njegovog inaktiviranja (22) (Slika 1). Većina beta-laktamaza djeluje tako da se najprije serinsko aktivno mjesto enzima nekovalentno veže s antibiotikom stvarajući nekovalentni Michelisov kompleks (20).



Slika 1. Prikaz razgradnje beta-laktamskog prstena pomoću enzima beta-laktamaze

(Izvor: Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. BMJ 2003; 327:1209-13.) (22).

Djelovanje beta-laktamaza ovisi o njihovom afinitetu za određeni supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini enzima i propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija (23). Do sada je poznato više od 500 beta-laktamaza koje se razlikuju po jedinstvenom slijedu aminokiselina i fenotipskim obilježjima (1).

1.2. Vrste beta-laktamaza

S obzirom na porijeklo, beta-laktamaze mogu biti kromozomske ili plazmidne (20). Kromozomske beta-laktamaze mogu biti konstitutivne ili inducibilne (20). Konstitutivne kromozomske beta-laktamaze se neprestano stvaraju, bez obzira na prisustvo beta-laktamskog antibiotika (23). Inducibilne kromozomske beta-laktamaze se stvaraju samo u slučaju kada je bakterija izložena djelovanju beta-laktamskog antibiotika (20). Neke bakterije imaju konstitutivne beta-laktamaze i stalno luče male količine enzima, ali kada su izložene djelovanju beta-laktamskog antibiotika, povećavaju višestruku količinu izlučenog enzima (24).

Plazmidne beta-laktamaze su kodirane prenosivim genetskim elementima - plazmidima i transposomima (25). Ustanovljeno je da su plazmidi i transposomi posredovali u širenju TEM-1 beta-laktamaza *E. coli* na druge vrste bakterija (26). Plazmidne beta-laktamaze nisu specifične za vrstu kao kromozomske, već se mogu širiti među različitim vrstama i rodovima bakterija (22). Među gram-negativnim bakterijama šire se konjugacijom, a među gram-pozitivnim bakterijama pomoću bakterijskih virusa - bakteriofaga (27).

Brojni rodovi gram-negativnih bakterija posjeduju kromozomski kodirane beta-laktamaze (20). Nastajanje ovih beta-laktamaza se povezuje sa selektivnim pritiskom beta-laktamskih antibiotika koje luče neki mikroorganizmi prisutni u okolišu (22). Paralelno sa uvođenjem novih antibiotika u liječenje infekcija, kao posljedica selektivnog pritiska i prevelike uporabe,

nastajale su nove vrste beta-laktamaza koje su uzrokovale otpornost (rezistenciju) bakterija na antibiotike (20).

1.3. Historijat nastanka beta-laktamaza

Široka uporaba penicilina, čija je klasična primjena započela četrdesetih godina prošlog stoljeća, djelovala je selekcijski, te je dovela do porasta otpornosti *Staphylococcus aureus* na penicilin, zbog lučenja plazmidom kodirane penicilinaze (20). Ova beta-laktamaza se ubrzo proširila i na druge vrste stafilokoka (26, 27). Sredinom 80-ih godina prošlog stoljeća već je više od 90% stafilokoka postalo otporno na penicilin (28). Problem je donekle riješen uvođenjem u terapiju beta-laktamaza stabilnih penicilina kao što su meticilin, oksacilin, kloksacilin i flukloksacilin ali su se ubrzo nakon toga pojavili meticilin-rezistentni stafilokoki (MRSA) koji su otporni na sve beta-laktamske antibiotike zbog promijenjenih PBP molekula. Posljedica primjene beta-laktamskih antibiotika bila je pojava i brzo širenje otpornosti putem plazmida i transpozona (20).

Prva plazmidom kodirana beta-laktamaza širokog spektra izolirana je u Grčkoj 1965. godine kod izolata *Escherichia coli*, a nazvana je TEM-1 po početnim slovima imena (Temoniera) žene iz čije je hemokulture (poslije apendektomije) izolirana (5, 25). Nakon pet godina od prve izolacije, TEM-1 beta-laktamaze su se proširile u cijelom svijetu, a i sada se otkrivaju kod različitih vrsta porodice Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, i *Neisseria gonorrhoeae* (26). Druga plazmidom posredovana beta-laktamaza širokog spektra pronađena kod *K. pneumoniae* i *E. coli* je SHV (engl. sulfhydryl variable)-1 beta-laktamaza (26). SHV-1 beta-laktamaza je kromozomski enkodirana kod većine izolata *K. pneumoniae*, dok je kod *E. coli* posredovana plazmidima (26). Osamdesetih godina prošlog stoljeća su u liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama uvedeni cefalosporini proširenog spektra djelovanja, koji imaju oksimino bočni lanac (oksimino-cefalosporini) u

koje spadaju cefotaksim, ceftazidim i ceftriakson (20). Ubrzo je u Njemačkoj otkriven prvi u nizu enzima koji su uzrokovali otpornost na tu skupinu antibiotika (20). Enzim SHV-2, koji je izoliran iz soja *K. oxytoca*, mutacijom je nastao iz enzima SHV-1 (29). SHV-2 i čitav niz enzima iz ove skupine koji su kasnije otkriveni, uzrokovali su rezistenciju na cefalosporine širokog spektra, te su zbog toga dobili naziv beta-laktamaze proširenog spektra (engl., extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) (20). ESBL su enzimi nastali mutacijom, tj. supstitucijom aminokiselina iz enzima TEM-1, TEM-2 i SHV-1 (30). Ubrzo nakon otkrića SHV-2, otkrivena je u bolnici u Clermont-Ferrandu u Francuskoj 1984. godine, cefotaksimaza TEM/CTX-1 (TEM-3) (31). Sasvim je sigurno da je klinička uporaba beta-laktamskih antibiotika glavni selekcijski faktor koji je doveo do pojave produkcije ovih beta-laktamaza kod bakterija (32).

1.4. Klasifikacija beta-laktamaza

Klasifikacija i nomenklatura beta-laktamaza je dugo bila problematična. Klasifikacije koje su do sada poznate su u osnovi funkcionalne (fenotipske) ili molekularne (33).

Funkcionalne klasifikacije se zasnivaju na funkcionalnim karakteristikama beta-laktamaza, kao što su njihov hidrolitički spektar, osjetljivost na inhibitore, izoelektrična točka ili molekularna težina. Molekularna klasifikacija je nastala na temelju određivanja slijeda aminokiselina (33).

1.4.1. Funkcionalne klasifikacije beta-laktamaza

Klasifikacija prema Sawai i suradnicima potječe iz 1968. godine i dijeli beta-laktamaze na penicilinaze i cefalosporinaze uz dodatno razdvajanje enzima na osnovu reakcije sa antiserumima (33).

Klasifikacija prema Jacku i Richmondu potječe iz 1970. godine. Po njoj se beta-laktamaze gram-negativnih bakterija dijele na osam tipova na osnovi supstratnog profila, reakcije sa antiserumima, vrste inhibitora (oksacilin ili p-kloromerkuribenzoat), te električnom naboju (34).

Klasifikacija prema Richmondu i Sykesu iz 1973. godine je uključivala sve beta-laktamaze gram-negativnih bakterija, koje su bile poznate u to vrijeme (35). Enzimi su podijeljeni u pet grupa označenih rimskim brojevima I-V na osnovi supstratnog profila, vrste inhibitora (kloksacilin, p-kloromerkuribenzoat), elektroforetske mobilnosti te molekularne težine. Skupina I prema ovoj klasifikaciji obuhvaća cefalosporinaze otporne na inhibiciju klavulanskom kiselinom, a osjetljive na inhibiciju kloksacilinom i karbencilinom. U skupini II su penicilinaze koje inhibira kloksacilin. U skupinama III-V su enzimi koji podjednako djeluju na peniciline i cefalosporine, ali se razlikuju po osjetljivosti na različite vrste inhibitora.

Klasifikacija prema Sykesu i Matthewu iz 1976. godine je proširena varijanta klasifikacije po Richmondu i Sykesu (24). Uz elemente prethodne klasifikacije po prvi put se u podjeli uzima u obzir genetsko podrijetlo beta-laktamaza (kromosomske ili plazmidne), te se koristi mogućnost razlikovanja plazmidnih beta-laktamaza pomoću određivanja izoelektrične točke.

U kromosomske beta-laktamaze prema ovoj klasifikaciji spadaju penicilinaze, cefalosporinaze i beta-laktamaze širokog spektra. Među ovim enzimima od penicilinaza najznačajniji su penicilinaza stafilokoka, te penicilinaza koju luče, među enterobakterijama, npr. *K. pneumoniae* i *Morganella morganii*, ali i *P. aeruginosa*. U cefalosporinaze, prema ovoj podjeli, ubrojene su kromosomske (uglavnom inducibilne) cefalosporinaze gram-negativnih bakterija (većina enterobakterija, te *P. aeruginosa*). Kromosomske beta-laktamaze širokog spektra uključuju enzime koje luče *Klebsiella* spp.

U plazmidne beta-laktamaze, prema ovoj podjeli, spadaju beta-laktamaze širokog spektra koje ne hidroliziraju izoksazolil peniciline i koji se mogu razlikovati samo po izoelektričnoj točki (TEM-1 i TEM-2), te one koje hidroliziraju izoksazolil peniciline (OXA-1, OXA-2, OXA-3).

Prema klasifikacija Mitsuhashi i Inoue iz 1981. godine prvi put je korištena kategorija „beta-laktamaza koja hidrolizira cefuroksim“, što je bio dodatak dotadašnjim podjelama koje su uključivale „penicilinaze“ i „cefalosporinaze“(36).

Nedostatke dotadašnjih klasifikacija, koji su tijekom godina postajali sve očitiji jer nisu omogućavale razlikovanje originalnih TEM i SHV enzima i njihovih sve brojnijih ESBL derivata, pokušala je ukloniti klasifikacija prema K. Bush iz 1989. godine (37), uz još jednu nadopunu 1995. godine (36) (Tablica 1).

Tabela 1. Klasifikacija beta-laktamaza po Bush-Jacoby-Medeiros*

Grupa	Osobine	Tipični predstavnici
1	Cefalosporinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom	AmpC
2a	Penicilinaze inhibirane klavulanskom kiselinom	PC1 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
2b	Enzimi širokog spektra inhibirani klavulanskom kiselinom	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	Enzimi proširenog spektra inhibirani klavulanskom kiselinom (ESBL)	TEM-3 do TEM-38, SHV-2 do SHV-6
2br	Enzimi širokog spektra sa smanjenom osjetljivošću na klavulansku kiselinu (IRT)	TEM-30 do TEM-36, TRC-1
2c	Karbenicilinaze inhibirane klavulanskom kiselinom	PSE-1, CARB-3
2d	Kloksacilinaze inhibirane klavulanskom kiselinom	OXA-1, PSE-2
2e	Cefalosporinaze inhibirane klavulanskom kiselinom	<i>Proteus vulgaris</i> SC 10950, L-2
2f	Ne-metalno karbapenemaze	IMI-1, NMC-A, Sme-1
3	Metalno beta-laktamaze	L1 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)
4	Penicilinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom	<i>Pseudomonas cepacia</i> 249, LCR-1

*Izvor (uz modifikaciju): Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:494-98 (27).

Klasifikacija prema Bush-u dijeli beta-laktamaze u četiri skupine označene brojevima 1-4.

Podjela se temelji na:

- supstratnom profilu, tj. brzini hidrolize penicilina, oksacilina, karbenicilina, cefaloridina, cefalosporina proširenog spektra djelovanja, monobaktama (aztreonam) te imipenema,
- osjetljivost na pojedine vrste inhibitora (aztreonam, klavulanska kiselina, sulbaktam, kloksacilin, etilen-diamin-tetra-ocetna kiselina (EDTA) i p-kloromerkuribenzoat),
- izoelektričnoj točki,
- molekularnoj težini,
- genetskom podrijetlu beta-laktamaza (36, 38).

Skupina 1 uključuje cefalosporinaze, koje ne inhibira klavulanska kiselina, a koje po molekularnoj klasifikaciji prema Ambleru spadaju u grupu C.

Skupina 2 obuhvaća penicilinaze, cefalosporinaze ili beta-laktamaze, koje su inhibirane klavulanskom kiselinom, spadaju u molekularnu klasu A i D. Zbog rastućeg broja derivata TEM i SHV enzima ova skupina je podijeljena u dvije podskupine, 2a i 2b.

Podskupina 2a sadrži samo penicilinaze, dok su u podskupini 2b beta-laktamaze širokog spektra koje mogu hidrolizirati podjednako i peniciline i cefalosporine.

Podskupina 2b je dalje podijeljena na dvije podskupine. Podskupina 2be, gdje slovo „e“ označava da se radi o „extended-spectrum“ djelovanju, tj. o ESBL enzimima koji mogu inaktivirati cefalosporine treće generacije (ceftazidim, cefotaksim i cefpodoksim), kao i monobaktame (aztreonam). Podskupina 2br, gdje „r“ označava enzime koji pokazuju smanjenu sposobnost vezivanja za klavulansku kiselinu i sulbaktam. Enzimi iz ove skupine se

nazivaju TEM beta-laktamaze rezistentne na inhibitor. Osjetljive su na inhibiciju tazobaktamom.

Kasnije je skupina 2 podijeljena u dodatne podskupine označene 2c, 2d, 2f i 2e.

Podskupina 2c obuhvaća enzime koje brže inaktiviraju karbenicilin nego benzilpenicilin ili kloksacilin.

Enzimi iz podskupine 2d brže inaktiviraju kloksacilin nego benzilpenicilin, a pokazuju i slabu aktivnost prema karbenicilinu, slabo ih inhibira klavulanska kiselina. Neki od njih su ESBL.

Podskupina 2e uključuje enzime cefalosporinaze koji također mogu hidrolizirati monobaktame, a inhibirani su klavulanskom kiselinom.

Podskupina 2f obuhvaća serinske karbapenemaze koje su na taj način izdvojene od cink-karbapenemaza iz grupe 3.

Skupina 3 sadrži cink ili metalo-beta-laktamaze (karbapenemaze) koje odgovaraju molekularnoj klasi B. To su jedini enzimi koji djeluju pomoću iona cinka. Mogu hidrolizirati peniciline, cefalosporine i karbapeneme. Tako karbapenemi mogu biti inhibirani enzimima iz grupe 2f i 3.

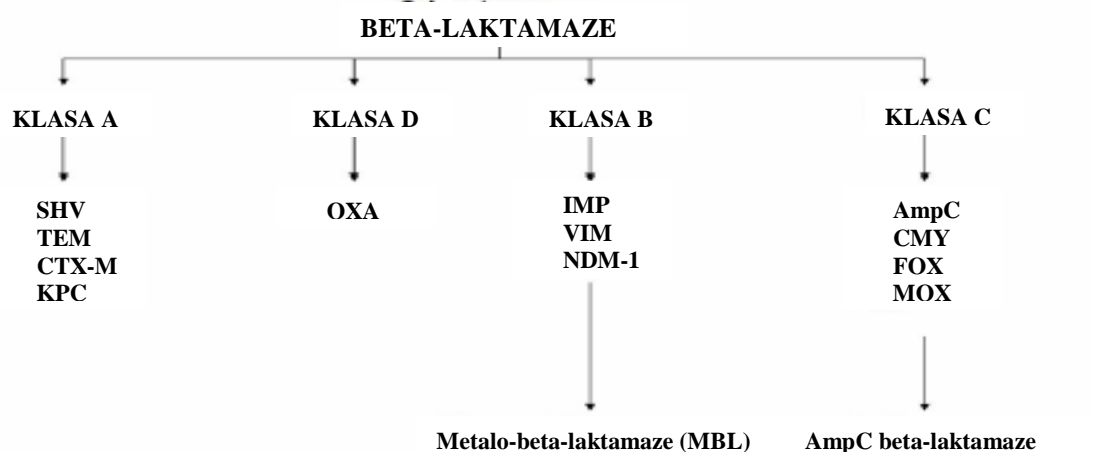
Skupina 4 uključuje penicilinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom i nemaju još određenu molekularnu klasu.

Molekularna klasifikacija beta-laktamaza prema Ambleru temelji se na slijedu nukleotida i aminokiselina u enzimima. Ambler je prvi 1980. godine klasificirao beta-laktamaze na osnovu molekularne strukture, u vrijeme kada su bile poznate samo četiri sekvence aminokiselina beta-laktamaza (39).

Prema ovoj klasifikaciji beta-laktamaze su podijeljene u četiri grupe označene slovima A-D (Slika 2). Enzimi iz skupine A, C i D su evolucijski različite serinske beta-laktamaze. U skupini A, čija su glavna obilježja aktivno serinsko mjesto, molekularna težina 29000 daltona (Da) i najbolje izražena aktivnost prema penicilinima spada, npr. penicilinaza *Staphylococcus aureus* i većina ESBL-producirajućih izolata.

U skupini B su metalo-beta-laktamaze kao što je ona koju proizvodi *Bacillus cereus*.

Skupinu C čine cefalosporinaze opisane prvi put 1981. godine (40), a skupinu D čine enzimi koji hidroliziraju oksacilin i koji su izdvojeni od ostalih serinskih enzima u kasnim 1980-tim godinama (36).



Slika 2. Molekularna klasifikacija beta-laktamaza po Ambleru
(Izvor: Taslima Y. Prevalence of ESBL among *Esch. coli* and *Klebsiella* spp. in a tertiary care hospital and molecular detection of important ESBL producing genes by multiplex PCR. Disertation 2012.) (41)

1.5. Beta (β) – laktamaze proširenog spektra djelovanja (ESBL)

ESBL su mutanti nastali od plazmidom posredovanih starijih derivata beta-laktamaza širokog spektra (TEM-1, TEM-2 i SHV-1), a koje posjeduju prošireni oblik substrata koji im omogućava hidrolizu cefalosporina, penicilina i aztreonama (42). Beta-laktamaze se dijele prema Ambler shemi na 4 klase, označene slovima od A do D, na osnovu njihovog

aminokiselinskog lanca, a među kojima su klase A i C učestalije među bakterijama (43). Beta-laktamaze proširenog spektra hidroliziraju oksimino-beta-laktamske spojeve u (22, 44). Beta-laktamaze proširenog spektra imaju dobru aktivnost na široki spektar penicilina i cefalosporina i monobaktama, a osjetljive su na inhibitore beta-laktamaza, kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (44). Beta-laktamaze proširenog spektra su općenito osjetljive na inhibitore beta-laktamaza (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam) (43). Zbog visoke otpornosti na do tada utemeljene antibiotike, ranih 1980-ih godina u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama uspješno su korišteni oksimino-cefalosporini (ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson), koji su bili otporni na hidrolizu beta-laktamazama širokog spektra (43). ESBL se najčešće nalaze kod *E. coli* i *K. pneumoniae* (22), ali se također mogu pojaviti i kod ostalih gram-negativnih bakterija, uključujući vrste *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Providentia*, *Morganela morganii*, *Serratia marcescens*, *Shigela dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* i *Capnocytophaga ochrocea* (45). Temeljem strukturnih aminokiselinskih sekvenci pomoću molekularnih metoda do sada je otkriveno više od 300 različitih ESBL varijanti (genotipova) koje su svrstane u devet porodica, a TEM i SHV enzimi predstavljaju glavne dvije porodice (46, 47). Većinom, u 93% slučajeva, ESBL kod izolata *Klebsiella* spp. su dobijene iz bolničkih uzoraka (48).

1.5.1. Tipovi beta-laktamaza proširenog spektra

Najvećim dijelom ESBL su derivati TEM-1 i TEM-2 (plazmidno kodirane beta-laktamaze *E. coli*) ili SHV-1 (kromozomski kodirani enzimi *K. pneumoniae*) (22, 49). Međutim, posljednjih godina su CTX-M beta-laktamaze postale najraširenija varijanta ESBL (43, 50-52) i u stalnom su porastu u većini zemalja. Klasifikacija po Richmond i Sykesu je bazirana na vrsti podloge i lokaciji kodiranih gena beta-laktamaza (35). Hidroliza beta-laktamskog prstena postoji kod svih beta-laktamaza i to nije svojstvo koje je tipično za ESBL, njih karakterizira

sposobnost hidrolize cefalosporina treće i četvrte generacije. Točkaste mutacije razlikuju pojedine varijante ESBL. Sve varijante imaju mutaciju na poziciji 238 i ona je odgovorna za hidrolizu novijih cefalosporina.

1.5.1.1. TEM beta-laktamaze

TEM-1 je najčešća beta-laktamaza gram-negativnih bakterija (20). Gotovo 90% otpornosti na ampicilin kod *E. coli* je uzrokovano produkcijom TEM-1 (20, 21). TEM-1 je također odgovorna za otpornost na penicilin i ampicilin sojeva *H. influenzae* i *N. gonorrhoeae* (21). TEM-1 hidrolizira peniciline i starije cefalosporine, poput cefalotina i cefaloridina (20). Prva mutanta nastala od TEM-1 nakon jedne jedine tačkaste mutacije aminokiselina je TEM-2 (20). Ta mutacija je dovela do pomicanja izoelektrične tačke (pI) od 5.4 na 5.6, ali nije uzrokovala promjenu supstratnog profila pa se TEM-1 i TEM-2 smatraju biohemijskim blizancima (53, 54). Od pojave prve TEM- ESBL, TEM-3, do danas je otkriveno više od 130 TEM enzima od kojih su neki otporni na inhibitore β -laktamaza (20). TEM beta-laktamaze su primarno otkrivene u Francuskoj, no danas su zastupljene širom svijeta (55).

TEM beta-laktamaze otporne na inhibitore (engl, inhibitor-resistant TEM, IRT) nisu ESBL (20), mada su one često spominjane kao ESBL budući su također derivati klase TEM ili SHV enzimskog tipa (22). Nastale su ranih 1990-ih kao odgovor bakterija na uvođenje inhibitora beta-laktamaza u kliničku praksu (20, 22). Ove su beta-laktamaze otporne na djelovanje klavulanske kiseline, te na kombinacije koje uključuju ove inhibitore, a inhibira ih tazobaktam kao i kombinacija piperacilina sa tazobaktamom (56). Beta-laktamaze otporne na ove inhibitore relativno slabo djeluju na cefalosporine treće generacije (54). Međutim, otkrivene su i takve mutante enzima (npr. TEM-68) koje predstavljaju kombinaciju ESBL i IRT fenotipova, te pokazuju otpornost na inhibitorno djelovanje klavulanata, a također i na

cefalosporine proširenog spektra (57). Postoji barem 19 različitih inhibitor otpornih TEM beta-laktamaza (22).

1.5.1.2. SHV-1 beta-laktamaza

SHV-1 beta-laktamaza je urođena kromosomski kodirana beta-laktamaza širokog spektra tipična za *K. pneumoniae* dok je u ostalih enterobakterija kodirana plazmidno. SHV-1 beta-laktamaza je odgovorna za intrinzičnu rezistenciju *K. pneumoniae* na ampicilin. SHV-1 beta-laktamaza je prisutna u svih sojeva *K. pneumoniae*, jer je u njih ona kodirana kromozomski (45). Po svojoj strukturi SHV-1 je u 68% slijeda aminokiselina identična TEM-1 (45). SHV beta-laktamaze nisu raznolike kao TEM, ima ih manje (20). Do sada je pronađena samo jedna varijanta koja je otporna na djelovanje inhibitora (inhibitor otporni fenotip) (20). To je enzim SHV-10 koji je derivat SHV-5 enzima (20). Enzim hidrolizira penicilin, ali je značajno reducirana njegova sposobnost inaktivacije cefalosporina (58). Iako većinu ESBL luče sojevi *K. pneumoniae*, ova vrsta enzima dokazana je i u sojeva *E. coli*, *Citrobacter diversus* i *P. aeruginosa* (59-61).

1.5.1.3. CTX-M beta-laktamaze

CTX-M skupina beta-laktamaza je relativno novija skupina ESBL koja hidrolizira cefalotin ili cefaloridin bolje od benzilpenicilina, te dobro hidrolizira cefotaksim i ceftriakson, a slabo ceftazidim (20). Tazobaktam ih deseterostruko jače inhibira od klavulanske kiseline (53,62). CTX-M enzimi su potekli od kromozomskih AmpC beta-laktamaza bakterijske vrste *Klyvera ascorbata* i *K. georgiana* horizontalnim prijenosom gena (63). CTX-M skupina beta-laktamaza pokazuju relativno malu srodnost s TEM i SHV enzimima (64). Prva CTX-M beta-laktamaza (CTX-M-1) otkrivena je 1989. godine u Njemačkoj, ubrzo i u Argentini (43), a do danas ova skupina broji više od 30 enzima (23). Najčešće ih luče sojevi *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Salmonella Enterica* serovar *Typhimurium*, ali su opisane i u drugih vrsta

enterobakterija (53). Njihovo širenje je najprije bilo izraženo u Južnoj Americi, da bi se do danas proširile na niz zemalja kao što su Španjolska (CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-14), Poljska (CTX-M-3, CTX-M-15), Francuska (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-20, CTX-M-21), Japan, Tajvan, Engleska i brojne druge (20). Njihova prevalencija među bakterijama u većem dijelu svijeta se dramatično povećala 1995. godine (43). U Njemačkoj početkom 1989. Bauernfeind i sur. su izvjestili o *E. coli* otpornoj na cefotaksim koja je producirala non-TEM i non-SHV ESBL, označene kao CTX-M-1, a koja je imala hidrolitičku aktivnost prema cefotaksimu (65). U Poljskoj, Gniadkovski et al. su 1996. otkrili varijantu CTX-M-1, i označili je sa CTX-M-3, kod različitih vrsta porodice Enterobacteriaceae (66). Epidemiološki izvještaji pokazuju da su neki enzimi mnogo učestaliji, pogotovo u klasi CTX-M beta-laktamaza u različitim državama (16). *E. coli* koja producira CTX-M-15 beta-laktamazu predstavlja veliki problem u svijetu, još od 2003. godine, i ona je važan patogen koji uzrokuje vanbolničke i bolničke infekcije (19). CTX-M enzimi (često CTX-M-14 i 27) su opisani u Aziji osobito u kasnim 1990-tim i ranim 2000-tim (6). Izvještaji iz Indije pokazuju da *E. coli* koja producira CTX-M-15 je veoma zastupljena među vanbolničkim i bolničkim uzorcima a prvi puta je opisana u Indiji (16). CTX-M-15 je najrasprostranjenija CTX-M beta-laktamaza diljem svijeta i zastupljena širom Europe, Azije, Afrike, Sjeverne Amerike, Južne Amerike i Australije (19). Grupa 9 (CTX-M-9 i CTX-M-14) je zastupljena najviše u Španiji i grupa 1 enzima (osobito CTX-M-3 i CTX-M-15) u cijelom svijetu (67).

1.5.1.4. OXA beta-laktamaze

Skupina OXA (engl., oxacilin-hydrolysing) je još jedna rastuća skupina ESBL koja je rasprostranjena među sojevima *P. aeruginosa* izoliranim u nekim područjima Turske i Francuske, među sojevima *Acinetobacter* spp., ali i u enterobakterijama (68). Kako istovjetnost slijeda aminokiselina unutar OXA skupine iznosi samo 20-30% homologne

sekvence među nekim članovima ove porodice, ona predstavlja više fenotipsku nego genotipsku grupu (54). Porodica OXA beta-laktamaza su fenotipski originalno kreirane u odnosu na genotipsku grupu kod nekoliko beta-laktamaza koje imaju specifičan profil hidrolize (22). OXA beta-laktamaze izazivaju otpornost na ampicilin i cefalotin, jako dobro hidroliziraju oksacilin i kloksacilin, a slabo su (osim OXA-18) inhibirane klavulanskom kiselinom (36). Zamjena aminokiselina kod OXA enzima može prouzrokovati ili dati ESBL fenotipove (69).

1.5.1.5. Ostale ESBL

U novije vrijeme pojavili su se enzimi koji imaju karakteristike ESBL, ali nisu srodni ni jednoj do tada poznatoj grupi ESBL enzima, npr. PER, BES-1, CME-1, VEB-1, SFO-1 (53, 54). Prvi takav enzim je PER-1 beta-laktamaza koja je prvi put otkrivena u Turskoj kod izolata *P. aeruginosa* (70). Kasnije je otkrivena i u sojeva *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* i *A. baumannii* (71). PER-2 je beta-laktamaza koja ima 86% homologije u slijedu aminokiselina s PER-1, izolirana je u Argentini također iz sojeva *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (53). VEB-1 enzim izoliran je iz *E. coli* u Vijetnamu, a kasnije i iz *P. aeruginosa* u Tajlandu (72). CME-1 izolirana iz *Chryseobacterium meningosepticum*, a TLA-1 u Meksiku iz soja *E. coli* (73). Sve ove beta-laktamaze (PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1) pokazuju samo 40-50% homologije u građi, uzrokujući otpornost na oksiminocefalosporine, osobito na ceftazidim, te na aztreonam (22, 53).

1.5.1.6. AmpC beta-laktamaze

Bakterije koje posjeduju AmpC beta-laktamaze otporne su na peniciline i cefalosporine, uključujući cefamicine te inhibitore beta-laktamaza (74). Rezistencija na cefamicine i inhibitore beta-laktamaza razlikuje ih od ESBL. Geni većine AmpC beta-laktamaza nalaze se na kromosomima i obično se nalaze u *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S.*

marcscensens i *M. morgani*. Plazmidne ampC beta-laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena navedenih vrsta na plazmid. Ekspresija kromosomskih (konstitutivnih) AmpC beta-laktamaza niskog je stupnja bez utjecaja antibiotika.

Prve opisane plazmidne AmpC beta-laktamaze su CMY-1 (1989.) i MIR-1 (1990.), a do danas je opisano 20 različitih tipova (MIR, CMY, BIL, FOX, LAT, itd.) od kojih je najzastupljenija CMY-2 (75). Bakterije koje posjeduju ESBL i AmpC beta-laktamaze predstavljaju veliki izazov za mikrobiologa i kliničara (74). U kombinaciji sa gubitkom porina, mikroorganizmi koji posjeduju AmpC beta-laktamaze otporne su i na karbapeneme (74).

1.5.1.7. Karbapenemaze

Karbapenemi su stabilni prema beta-laktamazama, jer ih ne hidroliziraju, osim karbapenemaza (69).

Nalazimo ih u izolatima enterobakterija i ne-fermentativnih bakterija kao što je *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Dijele se u klase A (GES, KPC, SME, IMI, NMC), B (IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM, DIM, AIM) i D (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58, OXA-143).

1.5.1.7.1. Klasa A karbapenemaza

GES enzim iz grupe A karbapenemaza prvi put je izolovan u Francuskoj 1998. godine iz izolata *K. pneumoniae* (76).

Među enzimima klase A, značajno mjesto zauzima plazmidom-kodirana *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza (KPC). Postoje tri vrste, koje se razlikuju po zamjeni jedne ili dvije aminokiseline. KPC-1 je pronađena u Južnoj Karolini, KPC-2 u Baltimoru i KPC-3 u New York-u. KPC klase A je najučestalija karbapenemaza, pronađena je u Južnoj Karolini,

SAD-u, 1996 i poslije se proširila širom svijeta. Izvještaji pokazuju da su enterobakterije koje produciraju KPC postale jako učestale u državama SAD-a (77).

SME enzim iz grupe A karbapenemaza, prvi put je izolovan u Londonu 1982. godine iz izolata *Serratia marcescens* (78).

IMI enzim se javlja sporadično i prvi put je izolovan 1984. godine u SAD-u iz izolata *E. cloacae*, a NMC enzim u Francuskoj 1990. godine (79).

1.5.1.7.2. Klasa B karbapenemaza

IMP enzim prvi put je opisan 1990. godine u Japanu i izolovan je iz *P. aeruginosa*, a IMP-2 otkriven je u Italiji kod izolata *A. baumannii* (80).

Druga najveća porodica karbapenemaza jeste Verona integron kodirana metalo-beta-laktamaza (VIM porodica). Prvi gen izolovan je u Italiji 1996. i sada broji oko 10 članova, otkrivenih širom svijeta, u Europi, Sjevernoj Americi i dalekom Istoku, kao i u SAD-u. VIM-1 je opisana u *P. aeruginosa* u Italiji, 1996. godine (69).

SPM-1 (Sao Paulo metalo-beta-laktamaza) je izolovana u Brazilu iz izolata *P. aeruginosa* (69).

GIM-1 (German imipenemaza) je prvi put opisana u Njemačkoj 2002. godine (76).

SIM-1 (Seoul imipenemaza) je otkrivena u Seoulu iz izolata *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (76).

NDM-1 (New Delhi metalo-beta-laktamaza) je prvi put opisana 2009. godine u Indiji kod izolata *K. pneumoniae* (76).

1.5.1.7.3. Klasa D karbapemenaza (oksacilinaze)

Prva oksacilinaza je opisana u Škotskoj 1985. godine iz izolata *A. baumannii*. Poznato je preko 239 enzima, svrstanih u 9 podgrupa (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-55, OXA-58, OXA-60 i OXA-62) (80).

1.6. Epidemiologija infekcija uzrokovanih sa gram-negativnim bakterijama koje produciraju ESBL

1.6.1. Geografska rasprostranjenost ESBL

Prevalencija enterobakterija koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra uvelike se razlikuje se s obzirom na zemljovidno područje.

Mikroorganizmi koji produciraju ESBL prvi put su otkriveni u Europi. Iako su prva izvješća bila iz Njemačke i Engleske, većina izvješća u prvom desetljeću nakon otkrića ESBL bila su iz Francuske (81). Prvi je val infekcija zabilježen u Francuskoj 1986. godine (81). Do ranih 1990-tih, u Francuskoj je 25-35% bolničkih infekcija bilo uzrokovano sa ESBL-producirajućim izolatima *K. pneumoniae*.

Praćenje prevalencije ESBL još iz 90-tih godina prošlog stoljeća pokazalo je postojanje velike zemljopisne razlike među europskim državama, a razlike su također značajne i unutar pojedinih zemalja. Sve objavljene studije potvrdile su da je u većini sjevernih europskih država učestalost ESBL izolata niža u usporedbi sa južnim i istočnim. Postotak ESBL izolata kreće se oko 28% u Bugarskoj, 16% na Cipru, 12% u Portugalu (82). Program MYSTIC (engl., Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) pokazao je značajan porast ESBL-producirajućih izolata *E. coli* u razdoblju od 1997. (2,1%) do 2006. godine (8,2%), te porast učestalosti izolacije ESBL među izolatima *K. pneumoniae* (od 9% do 9,8%), a nešto manje među izolatima *Proteus mirabilis* (1,4% u 2006. godini). Prema podacima

MYSTIC programa u Europi je učestalost ESBL izolata u 2000. godini bila najviša u Rusiji (oko 50%) i Poljskoj (oko 40%) (83). Podaci iz TEST studije (engl., Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) koji su uključili podatke iz 22 europske zemlje za razdoblje od 2000.-2007. godine, govore o udjelu ESBL kod izolata *K. pneumoniae* od 15.5%, te kod izolata *E. coli* od 9.8%, s najvećom učestalošću izolacije ESBL sojeva u Grčkoj, a najmanjom u Danskoj (84). U studijama praćenja učestalosti izolacije ESBL-producirajućih bakterijskih izolata, jedinice intenzivnog liječenja pokazale su se mjestima povećane prevalencije. U jednoj studiji (1997-1998) koja je evaluirala 433 izolata iz 24 jedinice intenzivne skrbi u zapadnoj i južnoj Europi, 25% izolata *K. pneumoniae* produciralo je ESBL (85). Slična studija prethodno je provedena 1994. godine od istih autora, a na temelju rezultata iz obje studije autori su zaključili da je ukupni udio ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. ostao isti, ali je udio jedinica intenzivnog liječenja u kojima su izolirani ESBL-producirajući izolati *Klebsiella* spp. porastao sa 74% na >90% (85, 86). Još je jedna velika europska studija, koja je uključila više od 100 jedinica intenzivne skrbi, pokazala različitosti u prevalenciji ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp.; od 3% u Švedskoj do 34% u Portugalu (87). U studiji koja je evaluirala izolate iz jedinica intenzivne skrbi i drugih bolničkih odjela u 25 bolnica u Europi zabilježeno je 21% izolata *K. pneumoniae* sa smanjenom osjetljivošću na ceftazidim (što je indikativno za ESBL produkciju) (88). Studija u Turskoj utvrdila je da 58% od 193 izolata *Klebsiella* spp. iz jedinica intenzivne skrbi, iz osam bolnica uključenih u istraživanje, su bili ESBL producenti (89).

U globalnoj studiji utemeljenoj na evaluaciji osjetljivosti bolničkih izolata na tige ciklin (TEST), udio ESBL-producirajućih izolata bio je najveći među izolatima *K. pneumoniae* prikupljenim u Latinskoj Americi, potom Aziji/Pacifiku, Europi te Americi (44.0%, 22.4%, 13.3% i 7.5%) (90). Prema rezultatima studije SMART (engl., Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends), udio ESBL-producirajućih izolata *E. coli* u Aziji/Pacifiku

bio je između 34.9% i 42.2%, a u Indiji i Kini 79% odnosno 54% (91). Dok je u SMART studiji dokumentiran peterostruki porast učestalosti ESBL-producirajućih izolata *E. coli* u Europi u razdoblju od 1997. do 2004. godine, u SAD je zamijećen pad s 5,1% na 1,4% (92), a samo su 4,4% izolata *Klebsiella* spp. u SAD-u 2004. godine bili ESBL producenti. Podaci o učestalosti ESBL-producirajućih izolata u jedinicama intenzivne skrbi u SAD upućuju na puno veću učestalost ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae*, koja je u 2003. godini iznosila 20,3% (69), što označava porast od 47% u razdoblju od 5 godina (93). Nadalje, procjenjuje se da 8,5%-11% izolata *K. pneumoniae* otpornih na ceftazidim u SAD-u proizvode i AmpC beta-laktamaze (94, 95).

U istraživanju provedenom na Novom Zelandu utvrđeno je da su tijekom 2000. godine samo 0,1% izolata *E. coli* iz mokraćnog sustava bili ESBL producenti (96). Međutim, od 2001. godine prati se porast učestalosti ESBL-producirajućih izolata iz godine u godinu, te su identificirani bolnički ESBL-producirajući izolati *E. coli* i *K. pneumoniae* (97). U jednoj velikoj bolnici u Aucklandu, Novi Zeland, 0,8% izolata *E. coli* i 2,6% izolata *K. pneumoniae* između 2001. i 2004. bili su ESBL producenti, što znači sedmerostruki porast u razdoblju od 2001. do 2004. godine (98). U istraživanju u koje je bilo uključeno 86% novozelandskih bolnica i dijagnostičkih laboratorija u domovima zdravlja tijekom razdoblja od 4 tjedna u 2006. godini, utvrđeno je da je učestalost ESBL-producirajućih izolata *E. coli* među izolatima iz mokraćnog sistema porasla sa 0,1% na 0,7%, uz još dramatičniji porast učestalosti izolacije ESBL-producirajućih izolata *Klesbiella* spp. od 4,2% (99). Autori navode da su ESBL enzimi CTX-M, osobito CTX-M-15, bili dominantni među ESBL-producirajućim izolatima *E. coli* i *K. pneumoniae* na Novom Zelandu (99).

1.6.2. Molekularna epidemiologija infekcija uzrokovanih sa ESBL producirajućim izolatima

Objavljena su mnoga istraživanja u kojima je molekularna tipizacija korištena u proučavanju epidemiologije bolničkih infekcija uzrokovanih sa ESBL producirajućim izolatima (100).

Prije razvoja metoda molekularne biologije, u procjeni genske povezanosti bolničkih mikroorganizama, korištene su fenotipske metode. Te metode uključuju biotipizaciju i procjenu osjetljivosti na antimikrobne lijekove. Ali, niti jedan od ovih testova nema mogućnost preciznog razlučivanja (101, 102). Većina istraživača danas koristi molekularne metode u određivanju genetičke srodnosti ESBL-producirajućih izolata. Najviše se koristi PFGE (engl., pulsed-field gel electrophoresis) kromosomske DNK. Također se koriste brojne varijacije lančane reakcije polimerazom (engl., polymerase chain reaction, PCR) (101, 102). Budući da se većina ESBL prenosi plazmidima, u epidemiološkim studijama koristi se i analiza plazmida. U svim studijama koje su se bavile infekcijama uzrokovanim izolatima *Klebsiella* spp., najmanje su dva bolesnika bili kolonizirani ili inficirani genotipski sličnim izolatima, što govori u prilog učestalom prijenosu s jednog bolesnika na drugog (101, 102).

Opisana je klonska diseminacija najmanje 5 različitih ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. u istim jedinicama u isto vrijeme (57). Dodatno, pripadnici pojedinog epidemijškog soja mogu nositi različite plazmide (koji nose različite ESBL gene). Nadalje, genotipski različiti sojevi mogu producirati iste ESBL zbog prijenosa plazmida od jednog soja na drugi (57).

Jedinice intenzivne skrbi često su žarište uzročnika koji produciraju ESBL. Opisano je da je više od 40% svih bolničkih ESBL-producirajućih izolata bilo preneseno od bolesnika iz jedinica intenzivne skrbi (66).

Također je opisano prenošenje genotipski sličnih ESBL od bolnice do bolnice unutar jednog ili različitih gradova, odnosno između različitih država (21). Iako se ESBL-producirajući

mikroorganizmi mogu i unijeti u jedinice intenzivne skrbi, epidemija infekcija iz intenzivnih jedinica prema drugim odjelima bolnice učestalija je i dobro je dokumentirana. ESBL-producirajući izolati također se mogu javiti i izvan intenzivnih jedinica. Izvor infekcija sa ESBL-producirajućim izolatima mogu biti i domovi za starije i nemoćne osobe te ustanove za skrb. U ovim ustanovama, također je opisan klonalni prijenos infekcija (21).

Izvorni enzim TEM-tipa ESBL, TEM-1, široko je rasprostranjen i u mnogim drugim izolatima, dok se SHV-1 ESBL učestalije izolira u *K. pneumoniae* u odnosu na druge bakterijske vrste. Gotovo svi izolati *Klebsiella* spp. koji ne produciraju ESBL, imaju kromosomski kodiranu SHV-1 beta laktamazu, dok je u ostalim enterobakterijama plazmidno kodirana. Većina ESBL enzima najprije je prepoznata u Europi (103, 104). ESBL je u Njemačkoj otkrivena 1983. godine u izolatu iz JIL, uočena po neuobičajenoj otpornosti na cefotaksim i ceftazidim i nazvana je SHV-2 (104). Vrlo brzo nakon toga je u Francuskoj 1984. g. izolirana *K. pneumoniae* s jednakim fenotipom i nazvana je TEM-3 (104). Enzim CTX-M je identificiran 1989. godine gotovo istodobno u Njemačkoj i Argentini, zatim u Francuskoj i Italiji (65). Prethodno je 1986. godine prepoznat u Japanu u *E. coli*. Do kraja 1990-tih u Europi su učestaliji bili tipovi SHV i TEM, no posljednjih godina značajno je porasla učestalost enzima CTX-M, a većina ovih izolata je otkrivena u izvanbolničkih bolesnika s infekcijom mokraćnog sustava. Smatra se da je glavni uzrok povećane izolacije ESBL sojeva koje pripadaju porodicama TEM (TEM-24, TEM-4, TEM-52), SHV (SHV5, SHV-12) te CTX-M (CTX-M-9, CTX-M-3, CTX-M-14 ili CTX-M-15) širenje specifičnih klonova ili klonalnih grupa, te epidemijskih plazmida, unutar bolnica i u izvanbolničkoj sredini (105).

U Japanu su CTX-M-laktamaze identificirane 1986 (106). Danas su mikroorganizmi koji proizvode ove enzime najčešći tip ESBL u većini država svijeta (107). Iako enzimi CTX-M pripadaju klasi A Amblerove klasifikacije, oni nisu povezani sa drugim ESBL, kao npr. TEM

ili SHV. CTX-M uključuje više od 80 različitih enzima koji su podijeljeni u 6 skupina i uključuju CTX-M skupine -1, -2, -8, -9, -25 i -45 (43). Enzimi CTX-M su aktivniji protiv cefotaksima i ceftriaksona nego ceftazidima (108). *E. coli* koja proizvodi ove enzime najčešće je odgovorna za izvanbolničke infekcije, iako može uzrokovati i bolničke, a infekcije uzrokovane bakterijama koje proizvode enzime TEM i SHV obično uzrokuju bolničke infekcije (4). Rizični čimbenici za nastanak izvanbolničkih infekcija uzrokovanih izolatima *E. coli* koja proizvodi CTX-M, uključuju ponavljajuće infekcije mokraćnog sistema, prethodno liječenje cefalosporinima ili fluorokinolonima, prethodnu hospitalizaciju, šećernu bolest, te bolesti jetre (109, 110). Dominantnost CTX-M enzima uočena je u mnogim zemljama svijeta (111), što je dramatičan preokret u odnosu na situaciju iz 1990-tih, kada su TEM i SHV tipovi ESBL bili dominantni, a tipovi CTX-M su tada bili rijetki, osim u Južnoj Americi (112). Među tipovima CTX-M čini se da je najčešći CTX-M-15. To je dominantni tip u mnogim studijama, uključujući Australiju, Veliku Britaniju, Francusku, Kanadu i Indiju (113). U Aziji se uz CTX-M spominje CTX-M-14 kao najčešći tip (6).

ESBL-producirajuće bakterije uzrokuju širok spektar oboljenja i stanja, od kolonizacije do ozbiljnih infekcija (44). Najčešće uzrokuju infekcije mokraćnog trakta, peritonitis, kolangitis i intraabdominalni absces (44). Infekcija ili kolonizacija sa ESBL-producirajućim bakterijama se obično javlja u jedinicama intenzivnog liječenja, a u posljednje vrijeme zabilježen je porast broja ESBL sojeva na kirurškim, pedijatrijskim, neonatološkim i onkološkim odjeljenjima (44).

Faktori rizika za razvoj ESBL su: plasiranje centralnog venskog ili arterijskog katetera, postojanje gastrostome ili jejunostome, plasiranje urinarnog katetera, hitne intraabdominalne operacije, gastrointestinalna kolonizacija, produženi boravak u jedinici intenzivne njege ili boravak u bolnici, prethodno primijenjeni antibiotici (uključujući treću generaciju

cefalosporina), te njihova količina i dužina trajanja uporabe, prethodni boravak u staračkom domu, težina bolesti, mehanička ventilacija, itd (114).

Kontaminirane ruke i stetoskopi prilikom pružanja zdravstvene njege su također važni faktori u širenju ESBL infekcija (115).

Prvi bakterijski izolat kod kojeg je otkrivena ESBL, je bila bakterija *Klebsiella oxytoca* 1983. godine u Njemačkoj, a nakon toga su uslijedila brojna izvješća o izolaciji ESBL kod Gram-negativnih bakterija širom svijeta, mahom iz bolničke sredine, gdje su ESBL bile često i uzročnici bolničkih epidemija (43, 116, 117-119). Prve bolničke infekcije uzrokovane sojevima koji proizvode ESBL opisane su 1985. godine u Francuskoj, te zatim u SAD-u krajem 1980-ih i početkom 1990-ih godina (44). Otpornost je bila uzrokovana mutacijom uobičajenih TEM-1, TEM-2 i SHV-1 beta-laktamaza koje su se proširile preko hidrolitičkih enzima na beta-laktamske lijekove (120). Od tada, mikroorganizmi koji produciraju ESBL su se proširili diljem svijeta (120).

Međutim, u posljednjih nekoliko godina došlo je do širenja infekcija uzrokovanih ESBL sojevima i u vanbolničkoj sredini (121-123). ESBL izolati iz vanbolničke sredine su prvi put zabilježeni 1998. godine u Irskoj, kod *E. coli* otporne na nalidiksičnu kiselinu, a koja je bila izolirana iz mokraće starijih pacijenata; tip enzima nije bio određen; pacijent nije bio ranije hospitaliziran, ali je primao višestruke kurseve antibiotika (124).

U epidemiologiji ESBL treba uzeti u obzir više različitih nivoa, kao što je individualni pristup svakom pojedinom pacijentu, vrstu medicinske institucije i geografsko područje (44).

Posljednjih 20 godina, više novih beta-laktamskih antibiotika je razvijeno na posebno dizajniran način sa ciljem postizanja otpornosti na hidrolitičku akciju bakterijskih beta-laktamaza (26). Međutim, sa svakom novom klasom lijeka koja je bila korištena u liječenju pacijenata, bakterije su gradile otpornost stvaranjem novih beta-laktamaza (26). Moguće da je

prekomjerno korištenje novih antibiotika u liječenju pacijenata stvorilo nove varijante beta-laktamaza (26). Zloupotreba antibiotika, osobito beta-laktamskih antibiotika širokog spektra djelovanja, olakšava nastajanje otpornosti i pojavu infekcija bakterijama koje produciraju ESBL, kao i prijenos ESBL sojeva iz bolničke sredine u vanbolničku (125, 126). ESBL sojevi enterobakterija su tipični bolnički patogeni (122). Prenošnje ESBL sojeva iz bolnice u vanbolničku sredinu je dokazano, naročito kod pacijenata nakon hospitalizacije (118), osobito onih koji su bili hospitalizirani u jedinicama intenzivne njege a potom otpušteni na kućnu njegu (122). Dokaz prijenosa ESBL u vanbolničku sredinu trebale bi pokazati i buduće studije, u cilju identifikacije rezervoara i načina prijenosa ESBL (127). ESBL izolate sa multiplom otpornošću važno je nadzirati (122). Laboratorijske studije u sjevernom dijelu Izraela otkrile su faktore rizika kod nastanka mokraćnih infekcija u vanbolničkoj sredini, uzrokovanih ESBL-producirajućim izolatima *Klebsiella* spp., a to su predhodna hospitalizacija, predhodna antibiotska terapija, muški spol, dobne starosti preko 60 godina i dijabetes melitus (124).

Stoga je, prije svega, kontinuirano praćenje svih bakterijskih izolata, u bolničkoj kao i u vanbolničkoj sredini, veoma važno kako bi se dobili podaci neophodni za sprovođenje empirijskog liječenja na lokalnoj razini, i kako bi se uvela kontrolirana upotreba antibiotika (128).

Tokom posljednje decenije, u mnogim studijama je utvrđeno prisustvo ESBL među enterobakterijama kod bolničkih pacijenata (50). Tako npr., u SAD-u je ustanovljena prevalencija ESBL kod 17,2% bakterija (*E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. mirabilis*) (50). Suprotno, širom Francuske, istraživanjima je otkrivena prevalencija ESBL kod enterobakterija od 3,2%, a ovi rezultati su bili podudarni sa istraživanjem u Japanu, gdje su ESBL detektovane kod manje od 10% izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella* spp. (50). U SAD-u

incidencija ESBL kod enterobakterija je oko 25%, u Europi oko 23-25% kod *K. pneumoniae* i 5,4% kod *E. coli* (115).

U kohortnoj studiji koja je trajala 3,5 godina u Univerzitetском medicinskom centru u Marilandu, 2% pacijenata bilo je kolonizirano sa ESBL-producirajućim *E. coli* i *Klebsiella* spp. (129).

1.6.3. Rezervoari ESBL

U brojnim studijama naglašena je selekcijska uloga antibiotika, naročito cefalosporina treće generacije, u širenju ESBL-producirajućih bakterija (54). Opaženo je također da su stacionari u kojima borave starije osobe važan rezervoar ESBL-producirajućih bakterija, a koji dovode do širenja takvih sojeva u bolničku sredinu nakon prijema ovih osoba (23, 59, 130). U populaciji starijih osoba se često propisuju antibiotici, što predstavlja visoki rizik za kolonizaciju ESBL-producirajućim bakterijama (najčešće kolonizacija debelog crijeva) (130). Tako se, u bolničkoj sredini, kolonizirani donji dio probavnog sustava bolesnika smatra najznačajnijim izvorom ESBL-producirajućih bakterija (131), a njihov prijenos među bolesnicima moguć je preko ruku medicinskog osoblja te kontaminiranih dijagnostičkih pomagala, kao što su termometri, ili gelovi koji se koriste pri ultrazvučnoj dijagnostici (131). Širenje ESBL-producirajućih bakterija je naročito izraženo unutar jedinica za intenzivno liječenje. Bolesnici u tim jedinicama su često imunosuprimirani i izloženi invazivnim dijagnostičkim i terapijskim postupcima, što sve doprinosi češćoj kolonizaciji i infekciji (54). Prijenos od bolesnika do bolesnika je dodatno pospješen velikom upotrebom antibiotika širokog spektra u takvim jedinicama, te nedostajućim, malim brojem zdravstvenog osoblja, što vjerovatno dovodi do često neadekvatne primjene mjera za sprečavanje širenja bolničkih infekcija (54).

1.6.4. Prevalencija ESBL infekcija

Među enterobakterijama, ESBL su najčešće prisutne kod *Klebsiella* spp. i *Escherichia coli*, ali u posljednje vrijeme su otkrivene i kod ostalih rodova enterobakterija, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, i *Serratia* (49). Tako je najveća učestalost ESBL u uzorcima bolničkih pacijenata ranije bila najvjerojatnije posljedica istraživanja fokusiranih isključivo na uzorke bolničkih pacijenata, te je njihovo prisustvo u uzorcima vanbolničkih pacijenata bilo potcijenjeno (122). ESBL su otkrivene u gram-negativnih štapićastih bakterija sa različitom prevalencijom, međutim, najveći broj ovih enzima otkriven je u porodici Enterobacteriaceae (44). Prevalencija ESBL-infekcija je najveća kod izolata *K. pneumoniae* u bolničkoj sredini, npr. u Jordanu prevalencija *K. pneumoniae* dostiže i do 80% (132), u Izraelu se kreće u rasponu od 32% do 70% (133), u Indiji (57%) (134), u Turskoj (50%) (132), u Egiptu (38%) (135), u Libanonu (20%) (136). Također, zabilježen je i porast incidencije ESBL kod bolničkih izolata *Salmonella* spp. u mnogim državama Južne Amerike, Afrike, Europe i Azije (44). Među gram-negativnim bakterijama koje ne pripadaju enterobakterijama uzročnici koji proizvode ESBL su mnogo rjeđi, među njima najvažniji su izolati *Pseudomonas aeruginosa* (44). Ovi mikroorganizmi su domaćini OXA tipa beta-laktamaza, međutim, oni proizvode i TEM, SHV i PER ESBL koje su otkrivene u nekim državama svijeta (44). PER beta-laktamaze su također bile otkrivene kod *Acinetobacter* spp. i *Alcaligenes faecalis* (44). Konačno, TEM -17 je otkrivena kod *Capnocytophaga ochrichea* i SHV-12 kod *Burkholderia cepacia* (44). Beta-laktamaze kod ovih mikroorganizama opisane su prvi put 1977. godine sa učestalošću oko 80% (137). *B. catarhalis* producira tri tipa beta-laktamaza, BRO-1, BRO-2 i BRO-3, ali se ipak razlikuju od onih otkrivenih kod drugih bakterija (137). ESBL organizmi su obično otkriveni u bolnicama, međutim, brojni izvještaji iz SAD-a i Francuske su dokumentovali mogućnost njihovog nastanka i u uvjetima kućne njege (44).

1.6.5. Dobna i spolna prevalencija ESBL

Mnogi autori navode da je prevalencija ESBL-producirajućih izolata općenito viša kod muškaraca u starijoj životnoj dobi, nego kod žena (128). Međutim, zabrinjavajući je podatak, da je velik udio ESBL-producirajućih bakterija izoliran kod dojenčadi, a sve je više rezultata istraživanja koji govore o epidemijama na neonatalnim odjelima, uzrokovanih ESBL-producirajućim enterobakterijama, do kojih dovodi širenje jednog ili više klonova, ili plazmidni prijenos *bla* gena između iste ili različitih bakterijskih vrsta (138). U Brazilu je u istraživanju sprovedenom kod bolničkih pacijenata ustanovljena specifična spolna prevalencija ESBL izolata od 68,0% kod muškaraca, a 32,0% kod žena (139). Od ukupnog broja ESBL-producirajućih izolata, 3,6% je bilo djece u dobi od 0-14 godina, 31,4% osoba od 15 do 64 godine, i 65% kod osoba iznad 64 godine (140). Knežević et al. su izvjestili o gotovo dva puta većoj prevalenciji ESBL-producirajućih sojeva *E. coli* kod starijih žena (4,1%) nego kod starijih muškaraca (2,1%), dok je zastupljenost ESBL-producirajućih sojeva *K. pneumoniae* kod starijih muškaraca bila 3,3 puta veća (41,7%) nego kod starijih žena (12,5%) (141). Prohaska-Potočnik et al. su u uzorcima mokraćne prikupljenih u dječijoj klinici ustanovili 69,2% ESBL producirajuće *E. coli* u dječaka u prvoj godini života (142). U jednoj Švicarskoj studiji na odjelu za neonatologiju, zabilježen je prijenos *E. coli* koja producira ESBL prilikom porođaja (vaginalnim putem) sa majke na novorođenče (143). U istraživanju u Bamaku, država Mali, kod 38 od 39 djece izolirane su jedna (u 78% slučajeva) do tri (u 22% slučajeva) ESBL-producirajuće Enterbacteriaceae (144). U Hrvatskoj je tokom 2005. godine udio ESBL-producirajuće *E. coli* iznosio 2%, a veliki broj izoliran je u djece dojenačke dobi, sugerirajući porodilišta kao moguće mjesto za stjecanje otpornih sojeva (145).

Sve veći udio u svjetskoj populaciji općenito čine starije osobe s pridruženim hroničnim bolestima, te kao posljedica, široku primjenu mokraćnih katetera, što tu skupinu čini posebno izloženom dodatnom riziku za nastanak infekcija mokraćnog trakta (141). Kao rizik nastanka

otpornosti *E. coli* prema fluorokinolonima u bolničkih pacijenata s infekcijama mokraćnog sistema (IMS) navodi se starija dob (>65 godina) i prethodna infekcija mokraćnog trakta, a Lin i sur. rizik razvoja otpornosti u *E. coli* prema ciprofloksacinu povezuju s upotrebom kinolona unutar dvije sedmice od uzorkovanja mokraće i prisutnim kateterom u mokraćnom traktu na dan uzorkovanja mokraće (146). U istraživanju provedenom u Hrvatskoj od svih ESBL-producirajućih izolata *E. coli* kod pacijenata muškog spola, 58,8% je izolirano kod djece uzrasta do desete godine života, a od toga 75% kod dječaka dojenačke dobi (147). Kod žena nije zamijećena razlika u učestalosti ESBL-producirajućih izolata *E. coli* s obzirom na dob, dok su ESBL-producirajući izolati *K. pneumoniae* bili najzastupljeniji kod žena generativne dobi (147). U istraživanju provedenom u Kanadi, 71% ESBL-producirajućih izolata je pripadalo pacijentima s vanbolnički stečenom infekcijom, češće su bili izolirani kod žena u svim dobnim skupinama, a najveća incidencija ESBL-pozitivnih izolata opažena je u dobnoj skupini starijih od 65 godina, dok je kod mlađih od 10 godina bila iznimno mala (147). U bolnici u Tajvanu, od 91 ESBL-producirajuća izolata *E. coli* dobijenih iz hemokulture, 56,0% je izolirano kod muškaraca (148).

1.6.6. Prevalencija ESBL u različitim vrsta gram-negativnih bakterija

U zemljama u razvoju, prevalencija ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* u bolničkoj sredini je općenito viša nego u drugih g-negativnih bakterija (149). Prema istraživanjima SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme, ESBL-producirajući izolati *K. pneumoniae* imaju veću prevalenciju u nekim geografskim područjima, npr. u Latinskoj Americi (45,4%), u zapadnoj pacifičkoj regiji (24,6%), Europi (22,6%), SAD (7,6%) i Kanadi (4,9%), u odnosu na prevalenciju *E.coli* (150). U Taiwanu prevalencija ESBL-producirajućih izolata se kretala u rasponu od 8,5% do 29,8% za *K. pneumoniae*, 1,5% do 16,7% za *E. coli* (151). U Koreji se prevalencija ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* kreće u rasponu od 22,5% do 22,8%, u *E. coli* u rasponu 4,8%-7,5% (152). U istraživanju koje je sprovedeno u Bankoku,

prevalencija ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* je viša u odnosu na *E. coli*, 64% prema 27% (153). U Pakistanu i Bangladešu prevalencija ESBL-producirajućih izolata *E. coli* (41% i 43.2%) je viša u odnosu na *K. pneumoniae* (36% odnosno 39.5%) (154).

U Brazilu je zabilježena prevalencija ESBL-producirajućih izolata *E. coli* od 13,2% i ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* od 12,7% (155). U istraživanju provedenom u državi Mali, ESBL-producirajući izolati su zabilježeni kod 56% *E. coli*, 36% *K. pneumoniae*, 4% *K. oxytoca* i kod 4% izolata *C. freundii* (144). U austrijskom istraživanju provedenom od 1998. do 2002., proporcija ESBL-producirajućih izolata *E. coli* iznosila je 0,06%-0,13%, nakon čega je uslijedilo povećanje učestalosti na 0,3% u 2003., 2,4% u 2006. godini, a prevalencija ESBL među *Klebsiella* spp. u periodu 1998-2004, kretala se od 0,6% do 1,6% (156). Tokom 2005-2006. godine, prevalencija ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. u Austriji se povećala, 3,8%-4,5%, a najčešće izolati su izolirani u jedinicama intenzivne njege (157).

1.6.7. Prevalencija ESBL u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata je općenito viša u bolničkoj sredini nego u vanbolničkoj, kao što su pokazali rezultati mnogih istraživanja (158). U istraživanju sprovedenom u Saudijskoj Arabiji, prevalencija ESBL-producirajućih izolata u bolničkoj sredini iznosila je 15.4% u odnosu na ESBL-producirajuće izolate kod vanbolničkih pacijenata, 4.5% ($p < 0.05$) (158). U Kuvajtu i Ujedinjenim Arapskim Emiratima je također zastupljena visoka prevalencija ESBL-producirajućih izolata kod bolničkih pacijenata, 31.7% odnosno 41% (159, 160). Marijan i sur. u istraživanju kod vanbolničkih pacijenata u Hrvatskoj su ustanovili prevalenciju ESBL-producirajućih izolata *E. coli* od 1,5%, a 4,1% kod *K. pneumoniae*, dok je svaka vrsta pokazivala drugačiju distribuciju s obzirom na dob i spol pacijenata (147). Pattarachavi K. i sur. (Brazil) su ustanovili predominaciju ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* kod pacijenata smještenih na jedinici intenzivne njege,

dok su ESBL-producirajući izolati *E. coli* preovladavali kod vanbolničkih pacijenata (155). U opsežnoj studiji u Čikagu (SAD) (2000-2005. godine), otkriveno je povećanje učestalosti prijenosa ESBL-gena, a time i povećanje rizika među bolničkim pacijentima sa 1,3% na 3,2%, te do pojave bakterijemije, čiji su uzročnici u 8,5% slučajeva bili predhodno identificirani kao ESBL-producirajući izolati (161).

1.6.8. Prevalencija ESBL-producirajućih izolata u različitim kliničkim uzorcima

Infekcije mokraćnog sistema su najučestalije od svih infekcija u bolničkih pacijenata (oko 40%) i uglavnom su udružene sa primjenom mokraćnih katetera, tako da u Americi ovaj udio iznosi 11,1%, u Francuskoj samo 4%, dok u bolnicama u Finskoj čak 34% (162). Podaci iz SAD pokazuju da je u periodu 1995.-1997. godine otpornost na ceftazidim izolata *K. pneumoniae* izolirane iz krvi bolesnika, registrovana u 12,7%, te da je bila učestalija nego u izolatima iz drugog kliničkog materijala, dok je svega 1,7% izolata *E. coli* iz krvi bilo otporno na ovaj antibiotik (162). Osobito rizičnu grupu za nastanak infekcija uzrokovanih sa sojevima *Acinetobacter* spp. predstavljaju bolesnici sa opekotinama (162). U Univerzitetskoj bolnici u Izraelu 54% izolata *A. baumannii* iz krvi bolničkih pacijenata bilo je multirezistentno (162). U Brazilu, ESBL-producirajuća *E. coli* i *K. pneumoniae* su izolirane najčešće iz mokraće 63,0% odnosno 56,0) (155). U Kalgariju u četverogodišnjoj studiji 17% je bilo ESBL, 90% pacijenata su imali infekciju mokraćnog trakta, 5% infekciju krvi, infekcija respiratornog trakta 2%, mekih tkiva i abdomena po 1% (163).

1.6.9. Prevalencija različitih tipova ESBL

CTX-M tip ESBL preovladava u vanbolničkoj, a TEM i SHV u bolničkoj sredini (122). Dokumentovano je da su CTX-M pozitivni izolati *E. coli* pokazali plazmidom-posredovanu antimikrobnu otpornost na sve penicilinske i cefalosporinske antibiotike u liječenju vanbolničkih infekcija (164). Širenje bakterija koje posjeduju CTX-M ESBL značajno je

izmijenilo način razmišljanja o liječenju vanbolničkih infekcija i dovelo je do ograničene upotrebe nekih oralnih antibiotika (164). Ovo se naročito odrazilo na odabir lijekova u liječenju djece, budući se fluorokinoloni i tetraciklini ne primjenjuju kod djece (164).

Oba tipa, TEM i SHV β -laktamaze, često su ograničene na bolničke izolate *Klebsiella* spp. (118).

U studiji izvedenoj u Koreji, prevalencija CTXM-15 među bolničkim ESBL-producirajućim izolatima je bila viša kod *E. coli* (44.6%) u odnosu na *K. pneumoniae* (17.4%). U istoj studiji prevalencija SHV-12 ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* je bila viša u odnosu na *E. coli* (12.3%/1.3%) (165).

U istraživanju u Kambodži u bolničkim uzorcima mokraće otkriveno je prisustvo TEM u 76,4%, a CTX-M kod 36,5%, gdje je prijenos CTX-M ESBL bio povezan sa otpornošću na fluorokinolone i aminoglikozide (166). U portugalskoj studiji 32% izolata *E. coli* su bili ESBL-producirajući izolati, od kojih su 98% bili nosioci *bla*_{CTX-M} gena (167). CTX-M su bile i predomirajuće ESBL među izolatima vrsta porodice Enterobacteriaceae u jedinicama intenzivne njege u SAD-u u 2007. godini (168). Praćenjem kliničkih izolata enterobakterija u bolnici u Filadelfiji u 2007. ustanovljeno je prisustvo CTX-M kod 48% ESBL-producirajućih izolata *E. coli* koje su bile otporne na cefalosporine (168). Statistički značajno povećanje prevalencije CTX-M je ustanovljeno u jednoj Hrvatskoj studiji među ESBL-producirajućim izolatima *K. pneumoniae* od 4,9% u 2003. godini na 17,3% u 2007. godini (121).

Metalo beta-laktamaze (MBL) ili karbapenemaze iz porodice VIM (Veronska imipenemaza) u Europi su, osim Italije, Francuske i Grčke, VIM-2 zabilježene i u Portugalu, Španjolskoj, Poljskoj, Belgiji, Njemačkoj, te u Hrvatskoj, a nedavno i u Srbiji (169, 170). Karbapenemaze su također proširene i u Aziji, te Južnoj i Sjevernoj Americi, i u Kanadi (169, 170). Karbapenemaze su se prvo pojavile u izolata *P. aeruginosa*, no u posljednje vrijeme su

opisane i u enterobakterija (171). Mortalitet (smrtnost) povezana sa produkcijom MBL se kreće od 18% do 67% (170). Metalo beta-laktamaze sposobne su inaktivirati brojne beta-laktamske antibiotike, uključujući karbapeneme koji su obično otporni na inaktivaciju β -laktamazama (172).

1.7. Čimbenici rizika za nastanak infekcija sa ESBL-producirajućim sojevima

Predmet mnogih dosadašnjih istraživanja je bio određivanje faktora rizika za nastanak infekcija čiji su uzročnici bakterije koje proizvode ESBL, te su oni identificirani i dobro definirani u bolničkoj sredini, kod pacijenata na hospitalizaciji (126). Ustanovljena je značajna povezanost između uzimanja antibiotika i pojave infekcije uzrokovane sa ESBL-producirajućim izolatima (48, 148, 173, 174). Time je potvrđena hipoteza da usljed selektivnog pritiska koji se javlja kod prekomjerne upotrebe cefalosporina treće generacije dolazi do pojave visoke razine otpornosti kod pripadnika porodice Enterobacteriaceae (173). Prethodno liječenje ciprofloksacinom ili trimetoprim-sulfametoksazolom je također faktor rizika za kolonizaciju mikroorganizmima koji produciraju ESBL kod pacijenata koji su na kućnoj njezi (175), kao što su pokazali Wiener i sur. da je prethodna upotreba ovih lijekova neovisan pokazatelj nastanka otpornosti *E. coli* na ceftazidim kod bolesnika na kućnoj njezi (176). Saznanje o izlaganju nekom antibakterijskom lijeku može pomoći liječnicima da predvide eventualnu pojavu otpornosti (176). Prevalencija otpornosti na antibiotike varira ovisno od geografskog područja mahom zbog različitosti u propisivanju i upotrebi antibiotika pri liječenju infekcija (119, 121, 122). Osim ovoga, drugi najčešći faktori koji se dovode u vezu sa nastankom ESBL infekcija kod bolničkih pacijenata su prisutnost intravenoznih i mokraćnih katetera, renalna insuficijencija, kod pacijenata na mehaničkoj ventilaciji,

prethodni boravak u bolnici (148, 173, 174). Najčešće su uz nastanak ESBL infekcija povezani i starost iznad 65 godina, kao i muški spol (119).

Nasuprot brojnim istraživanjima o faktorima rizika kod hospitaliziranih bolesnika, istraživanja ovih faktora kod infekcija nastalih u vanbolničkoj sredini nisu česta (121-123), ali je i kod ovih infekcija upotreba antibiotika, cefalosporina širokog spektra, kao i fluorokinolona, također povezana sa pojavom ovih infekcija (174).

Infekcije uzrokovane ESBL pozitivnim mikroorganizmima češće se javljaju kod imunokompromitiranih pacijenata, stvarajući poteškoću u liječenju infekcija uzrokovanih ovim mikroorganizmima u jedinicama intenzivne njege u bolnicama (177). Isto tako, kod pacijenata na kućnoj njezi, koji su stariji, slabiji i koriste više lijekova istovremeno, naročito u višechlanim kućanstvima, postoji rizik pojave otpornosti na antibiotike (176). Ispitivanjem valjanosti nadzora kontrole infekcija u Ontariu pokazalo se da primjena ne-standardnih metoda u kontroli infekcija dovodi do pojave ESBL-producirajućih izolata kod *E. coli* i *Klebsiella* spp. u bolesnika sa produženom njegom (176). Odgovarajuća praktična primjena kontrole infekcija predstavlja ključni faktor kod prevencije širenja ESBL-producirajućih izolata (115). Glavne mjere u kontroli infekcije bile bi često i obavezno pranje ruku bolničkog osoblja, jačanje mjera predostrožnosti, i izolacija pacijenata koloniziranih ili inficiranih sa ESBL-producirajućim izolatima (115). Ostale mjere uključuju smanjenje širenja ovih mikroorganizama kliničkim i bakteriološkim nadzorom (mikrobiološka obrada sumnjivog i infektivnog materijala) kod pacijenata primljenih u jedinice intenzivne njege i ograničena (kontrolirana) primjena antibiotika, osobito kod empirijske upotrebe antibiotika širokog spektra, kao što su treća i četvrta generacija cefalosporina i imipenema (115). Tako je npr. ustanovljeno da prethodna upotreba cefalosporina treće generacije kod pacijenata sa gastrostomom koji su na kućnoj njezi predstavlja faktor rizika za nastanak infekcija sa enterobakterijama otpornim na ove antibiotike (176). Infekcije uzrokovane ESBL-

producirajućim izolatima najčešće napadaju imunokompromitirane osobe, stvarajući poteškoću u eradikaciji ovih mikroorganizama u jedinicama intenzivne njege (49).

Ustanovljeno je da su pacijenti koji su inficirani ESBL-producirajućim izolatima koji su otporni na cefalosporine treće generacije, imali duži boravak u bolnici, veću stopu smrtnosti, i veće troškove liječenja (176).

Nadalje, evidencija o prisustvu ESBL-producirajućih izolata kod stoke, peradi, pasa i mačaka ukazuje na to, da hrana pripravljena za životinje i kućne ljubimce može biti, također, pogodan način prijenosa ovih bakterija (118).

1.8. Liječenje infekcija uzrokovani sa ESBL

Zbog sposobnosti ESBL-producirajućih izolata da hidroliziraju mnoge beta-laktamske antibiotike, nije začuđujuće da je izbor antibiotika za liječenje ovih infekcija značajno reduciran. U nedavnom izvješću Američkog društva za infektivne bolesti (engl., Infectious Diseases Society of America) ESBL-producirajuć izolati *E.coli* i *K.pneumoniae* su uključeni u popis od 6 otpornih uzročnika infektivnih bolesti za koje su hitno potrebne nove terapijske mogućnosti (178). Nadalje, plazmidi koji prenose gene koji kodiraju ESBL, često nose i gene koji kodiraju otpornost na aminoglikozide, trimetoprim/sulfametoksazol i fluorokinolone. Čak i kada ne postoji plazmidima kodirana otpornost na kinolone, povezanost između otpornosti na fluorokinolone i produkcije ESBL je snažna. Razlozi za ovo nisu u potpunosti razjašnjeni. Ustanovljeno je da je 60% bakterija koje su bile otporne na ciprofloksacin producirale i ESBL, u odnosu na 16% bakterija koje nisu bile otporne na ciprofloksacin (179). Martinez i sur. su pažljivo analizirali mehanizme otpornosti na flurokinolone u bolničkim izolatima *K. pneumoniae* i opazili su gubitak porinskih kanala samo u onih izolata *K. pneumoniae* koji su producirali ESBL. Važno je napomenuti da bolesnici inficirani ESBL-producirajućim izolatima, kao i onim otpornim na fluorokinolone, često imaju povećanu terapijsku primjenu

cefalosporina proširenog spektra i kinolona. Posebice je kod izolata sa CTX-M tipom ESBL česta i korezistencija na kinolone (4). Antimikrobni lijekovi koji se uobičajeno koriste za empirijsko liječenje ozbiljnih izvanbolničkih infekcija, kao što je 3. generacija cefalosporina, najčešće nisu učinkoviti za sojeve ESBL (180). Empirijsko antimikrobno liječenje treba biti individualno i zasnovano na podacima antimikrobne osjetljivosti u lokalnoj sredini (države, grada, ustanove) (181). Druga činjenica je da čak i izbor antibiotika prema antibiogramu odnosno *in vitro* osjetljivosti bakterija ne jamči uspjeh *in vivo*. U nekim studijama je zamijećen smanjen klinički učinak protiv sojeva ESBL nekih beta-laktamskih antibiotika unatoč njihove osjetljivosti *in vitro*, dok su druge studije pokazale dobar klinički ishod s kombinacijom beta-laktama/inhibitora beta-laktamaze (182). Vjeruje se da je to rezultat tzv. inokulum efekta koji nastaje kada minimalna inhibitorna koncentracija antimikrobnog lijeka raste (tj. antibakterijski lijek gubi aktivnost) s porastom veličine inokuluma (broja) testiranih bakterija. To je opisano za cefalosporine, kombinaciju betalaktama/ inhibitora beta-laktamaza (npr. piperacilin/tazobaktam i manje amoksicilin/klavulanska kiselina) (183) i u manjoj mjeri za fluorokinolone (184). Kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaza obično su učinkovite protiv ESBL-producirajućih izolata. Međutim, većina izolata sada producira više tipova ESBL, što smanjuje učinkovitost ovih kombinacija lijekova, te je opravdanost njihove primjene u ovim infekcijama upitna. *In vitro* otpornost ESBL-producirajućih izolata na ove kombinacije lijekova je u jednoj studiji iz 35 JIL u Europi, porasla sa 31% u 1994. godini na 63% u 1998. godini. Cefamicini, uključujući cefoksitin i cefotetan, su stabilni na hidrolizu enzimima ESBL i pokazuju osjetljivost. Ipak se ovi lijekovi ne preporučuju zbog mogućnosti razvoja otpornosti tijekom terapije (185).

Karbapenemi *in vitro* imaju najkonzistentniju aktivnost protiv ESBL-producirajućih izolata, te se smatraju antibioticima izbora. To podupiru i rezultati brojnih kliničkih studija (186). Karbapenemi, uključujući imipenem, meropenem, doripenem i ertapenem, su lijekovi prvog

izbora za ozbiljnije infekcije uzrokovane ESBL-producirajućim enterobakterijama. Ovi lijekovi su vrlo stabilni na hidrolizu enzimima ESBL, postižu dobre koncentracije u tjelesnim tkivima i ne pokazuju „učinak inokuluma“ (186). Potencijalno negativni aspekti liječenja su visok trošak, parenteralna primjena i potencijalna selekcija otpornih izolata (187). Nema za sada dokaza da je kombinacija karbapenema i antibiotika drugih skupina učinkovitija od korištenja samo karbapenema. Uporaba karbapenema u liječenju infekcija ovim sojevima je u porastu, jer su jedina skupina antibiotika na koje su ovi sojevi bakterija gotovo jednako osjetljivi (188). No, neracionalno empirijsko liječenje kod sumnje na infekciju ESBL-producirajućim enterobakterijama dovodi do porasta otpornosti na karbapeneme drugih bakterija (npr. *P. aeruginosa* i *A. calcoaceticus*) (188, 189), a postoje izvješća i o pojavi otpornosti *E. coli* i *K. pneumoniae* koje produciraju ESBL na karbapeneme (190). ESBL-producirajuće bakterije su otporne na mnoge antimikrobne lijekove (191). Infekcije uzrokovane enterobakterijama otpornim na cefalosporine predstavljaju posebnu brigu, kako kod pacijenata sa kroničnom, tako i kod onih sa akutnom infekcijom (176). Cefalosporini proširenog spektra (engl., extended-spectrum cephalosporins, ESC) su važni u liječenju oboljelih od ozbiljnih infekcija uzrokovanih npr. sa vrstama *Salmonella* (192). Ova klasa lijekova naročito je važna kod liječenja u pedijatrijskoj populaciji budući da fluorokinoloni nisu odobreni za korištenje kod djece (192). U 2000. godini prema podacima CDC (engl., Center for Disease Control), 25% laboratorijski potvrđenih slučajeva infekcija sa vrstama *Salmonella*, zabilježeno je kod djece mlađe od 5 godina (192). Osim otpornosti na sve beta-laktamske antibiotike (sa izuzetkom karbapenema), ESBL-producirajući izolati su multiplo rezistentni (engl. multidrug resistance, MDR) i na niz drugih antibiotika, najčešće istovremeno na aminoglikozide, trimetoprim–sulfametoxazol i kinolone (53, 122). Stoga, kod infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim izolatima, rizik neadekvatnog empirijskog liječenja je visok, budući je potrebno najmanje 48 sati da bi se dobili rezultati testiranja

osjetljivosti na antibakterijske lijekove (antibiogram) (116, 117). Usljed toga, osim što je česta pojava terapijskog neuspjeha, pa i smrtnog ishoda usljed neodgovarajućeg liječenja ovih infekcija, veliki su svakako i ekonomski gubici nastali usljed odlaganja izliječenja te produženog boravka pacijenata u bolnici (116, 193). Prema posljednjem izdanju CLSI (engl., Clinical Laboratory Standard Institute), ESBL-producirajući izolati trebali bi se smatrati otpornim na sve cefalosporinske antibiotike osim na imipenem, neovisno o vrijednostima minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) (193, 194).

Tablica 2. Preporuke za liječenje teških infekcija uzokovanih ESBL-producirajućim bakterijama

Tip infekcije	Terapija prvog izbora	Alternativna terapija
Bakterijemija	Karbapenem (imipenem ili meropenem)	Ciprofloksacin
Infekcije respiratornog trakta	Karbapenem (imipenem ili meropenem)	Ciprofloksacin
Intraabdominalne infekcije	Karbapenem (imipenem ili meropenem)	Ciprofloksacin ili cefamicin
Infekcije mokraćnog trakta	Ciprofloksacin	Amoksicilin/klavulanat
Meningitis	Meropenem	Dodatak polimiksina B

Izvor: Humaniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Klyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-ancoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3045-49 (195).

Aktivnost antibiotika u infekcijama mokraćnog sistema (IMS) može biti precijenjena na temelju rezultata *in vitro* istraživanja usljed smanjene antimikrobne aktivnosti antibiotika u mokraći (*in vivo*) što se može objasniti niskim pH vrijednostima u mokraći i prisustvom dvovalentnih kationa (167). Međutim, prednost u liječenju IMS je, što većina antibiotika postiže vrlo visoke koncentracije u mokraći i to poništava učinak smanjenja njihove aktivnosti, tako da većina antibiotika zadržava djelotvornost u liječenju, ako je uzročnik osjetljiv (167). U otpornih sojeva mokraća može dodatno smanjiti antimikrobnu aktivnost antibiotika (167). Iz toga proizlazi da je učinak mokraće najznačajniji u sojeva s graničnim vrijednostima MIK-a koje se kreću oko prijelomne točke (167). Tako, karbapenem je obično preporučan kao lijek

izbora za liječenje ozbiljnih infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode ESBL, mada sve veća pojava otpornosti na karbapeneme je zabrinjavajuća (175). Alternativno, fluorokinoloni i aminoglikozidi se mogu koristiti ukoliko se testiranjem *in vitro* pokaže njihova aktivnost (115). Kombinacija beta-laktamskih antibiotika/inhibitora beta-laktamaza, kao što je npr. amoksisilin-klavulanat i piperacilin-tazobactam, te cefoperazon i sulbaktam, mogli bi se smatrati također dodatnom opcijom u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim izolatima (115).

Enterobakterije koje proizvode ESBL, sve su značajniji patogeni u mokraćnom traktu, i u bolnicama i vanbolničkoj sredini (167). Prevalencija otpornosti na antibiotike varira u ovisnosti od geografskog područja, različita je u bolničkih u odnosu na vanbolničke pacijente, uglavnom zbog različite upotrebe antibiotika i različite primjene u kontroli infekcija (122). Otpornost je obično nastala usljed korištenja antibiotika prilikom suzbijanja IMS, budući su ove infekcije najčešće, što ujedno čini problem u liječenju ovih infekcija (122).

Djelotvornost antibiotika *in vivo* ovisi o svojstvima bakterijskog soja i njegovoj osjetljivosti s jedne strane, te o svojstvima domaćina s druge strane, kao što su gastrointestinalna absorpcija, distribucija lijeka, metabolizam i ekskrecija (167). Sva ta svojstva podliježu značajnim individualnim i vremenskim varijacijama (167). Neke studije su pokazale da rezultati *in vitro* istraživanja mogu precijeniti aktivnost, ili potcijeniti antimikrobnu aktivnost antibiotika koji se koriste za liječenje infekcija mokraćnog trakta (167).

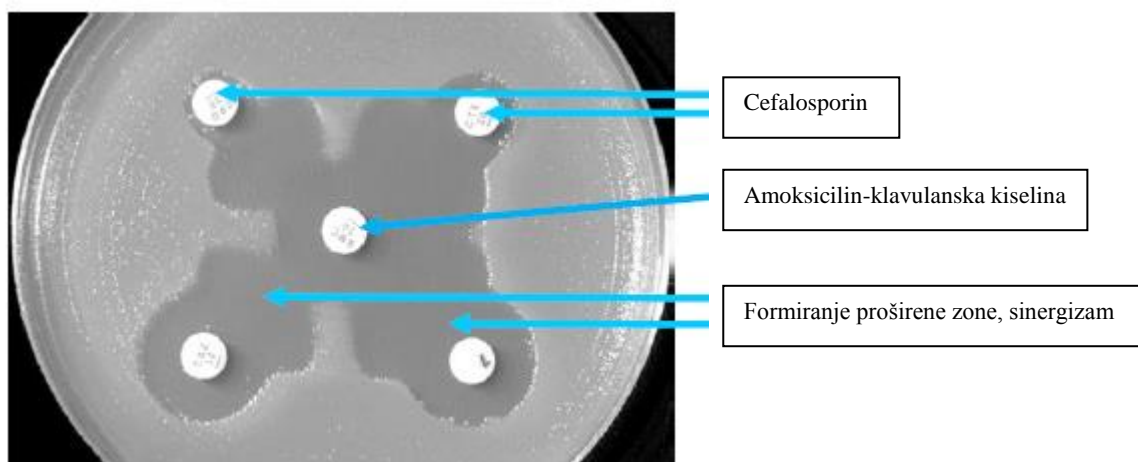
1.9. Laboratorijska detekcija ESBL

Porast učestalosti ESBL-producirajućih sojeva i njihovo značenje za odabir prave antimikrobne terapije, ukazao je na potrebu razvoja adekvatnih laboratorijskih testova za detekciju ESBL i njihovu identifikaciju. Metode za detekciju ESBL mogu biti fenotipske (metode kliničke mikrobiologije) ili molekularne. Fenotipske metode se temelje na

sinergističkom djelovanju cefalosporina treće generacije i klavulanske kiseline (23). Klavulanska kiselina inhibira ESBL-producirajuće izolate i tako ponovno uspostavlja osjetljivost na cefalosporine (196). Danas se preporučuje upotreba cefpodoksima, kao indikatorskog cefalosporina u ovim testovima, jer ga podjednako hidroliziraju i TEM i SHV, kao i CTX-M beta-laktamaze (196).

1.9.1. Metoda dvostrukog diska (DDST)

Ovaj test se najčešće koristi u laboratoriju za dokaz ESBL. Na sredinu ploče Mueller-Hinton agara sa nanesenim sojem se stavlja disk amoksicilina sa klavulanskom kiselinom (30/10 µg), a oko njega na udaljenosti od 2 do 3 cm stavljaju se diskovi cefalosporina treće generacije i aztreonama. Širenje inhibicijske zone oko diskova cefalosporina prema disku koji sadržava klavulansku kiselinu znači pozitivan rezultat testa (197).



Slika 3. Dvostruki disk-sinergistički test. Cefepim, ceftazidim, cefotaksim i cefpodoksim antibiotici se stavljaju oko diska amoksiklava u razmaku od 2,5 cm. Formiranje proširene zone trbušića, tj. sinergizma između diska amoksiklava i diska cefalosporina upućuje na produkciju ESBL (Izvor: Sturenburg E, Sobottka I, Feucht HH, Mack D, Laufs R. Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum beta-lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 45(1), 29-34 (198).

1.9.1.1. Disk-difuzijski test sa inhibitorom za detekciju ESBL i AmpC beta-laktamaza

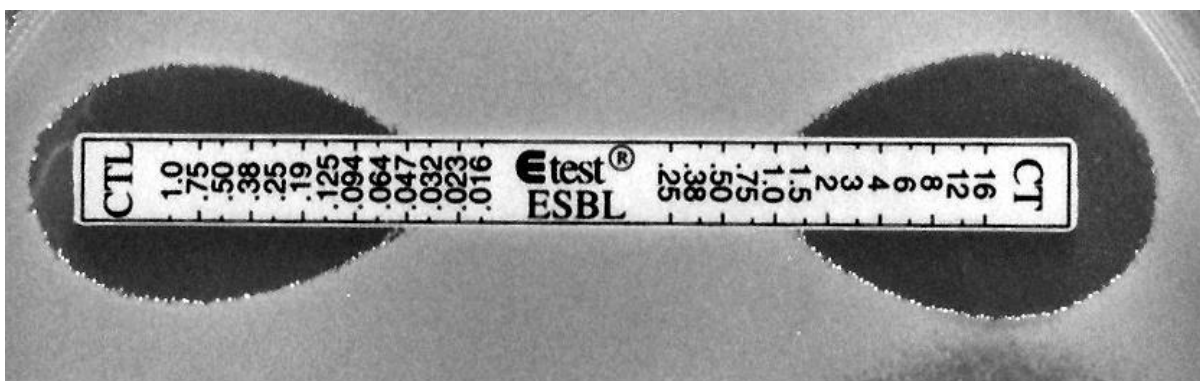
Ovaj test je modifikacija DDS testa u kojoj se klavulanska (za detekciju ESBL) ili fenilboronična (za detekciju AmpC) dodaje na diskove u koncentraciji od 4 mg/L. Diskovi cefalosporina se postavljaju na površinu agara. Test se smatra pozitivnim ako je došlo do proširenja zone inhibicije oko diska cefalosporina od najmanje 10 mm na agaru sa klavulanskom kiselinom ili fenilboroničnom (23).

1.9.1.2. Trodimenzionalni test

Ovaj test je specifičniji od DDS testa, ali je kompliciraniji za izvođenje (23). Na ploči Mueller-Hinton agara se nakon nanošenja soja napravi urez u koji se stavlja suspenzija soja. Diskovi antibiotika se postavljaju na udaljenost od 3 cm od ureza. Test se smatra pozitivnim ako zona inhibicije nije pravilna (199).

1.9.1.3. Epsilon (E) test

U ESBL E-testu koriste se komercijalne trake na koje je nanešen antibiotik, tako da je sa jedne strane, npr. ceftazidim, a sa druge ceftazidim u kombinaciji sa klavulanatom. Test je pozitivan ako je MIK ceftazidima sa klavulanatom za najmanje 3 razrjeđenja manji od MIK-a ceftazidima samog (23).



Slika 4. Interpretacija E-testa: ESBL pozitivan test: $MIK_{CT/CTL} = 1.5/0.047 = 32$ (AB BIODISK, Dalvågen 10; 169 56 Solna, Sweden).

1.9.1.4. Metode detekcije AmpC beta-laktamaza

Ne postoje CLSI smjernice za detekciju AmpC beta-laktamaza. Detekcija AmpC beta-laktamaza još je teže nego detekcija ESBL (200). Bakterije koje produciraju AmpC beta-laktamaze ne moraju nužno biti otporne na cefalosporine proširenog spektra koristeći koncentracije antibiotika prema CLSI. Za sada nije potvrđen niti jedan test probiranja niti potvrde produkcije AmpC beta-laktamaza. U odsutnosti ovih testova, mogu se koristiti surogatni markeri koji bi ukazivali na produkciju pAmpC temeljeno na njihovoj otpornosti na cefamicine i kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza. Otpornost na cefoksitin uz otpornost na cefalosporine proširenog spektra i očuvanu osjetljivost na cefepim, upućuje na prisutnost AmpC beta-laktamaza (200).

Nadalje, otpornost na cefalosporine proširenog spektra, kao npr. ceftazidim, i kombinaciju sa inhibitorom beta-laktamaza, također upućuje na prisutnost AmpC betalaktamaza. Iako su ovi testovi osjetljivi za detekciju prisutnosti AmpC beta-laktamaza, niti jedan nije specifičan, a rezultati su ovisni o vrsti bakterije ili testirane beta-laktamaze (200). Neki mikroorganizmi imaju povišen MIK za cefoksitin ili kombinacije betalaktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze. Neovisno o izboru metode probiranja, još uvijek nedostaju validni testovi (200).

1.9.2. Molekularni testovi za detekciju ESBL

Kako fenotipski testovi samo identificiraju ESBL-producirajuće izolate, sa pojavom novih ESBL razvijale su se i tehnike detekcije i identifikacije ESBL gena uz pomoć molekularnih metoda (53), kao što su: oligotipizacija (engl., oligotyping) (201), lančana reakcija polimeraze (engl., Polymerase Chain Reaction, PCR) (21), analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimeraze (engl., Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction, PCR-RFLP) (202), te analiza

konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA nakon lančane reakcije polimeraze (engl., Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism, PCR-SCP) (203).

1.9.2.1. Oligotipizacija

Ovo je prva molekularna metoda koja je korištena za detekciju gena koji kodira beta-laktamaze (*bla* gen). Oligonukleotidne DNA probe (označene radioizotopom ili biotinom), specifične za TEM i SHV enzime, koriste se za detekciju točkastih mutacija pod strogim hibridizacijskim uvjetima (201).

1.9.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je najjednostavnija i najčešće korištena metoda za detekciju i identifikaciju beta-laktamaza u kojoj se koriste oligonukleotidni začetnici („primeri“) specifični za gene određenih beta-laktamaza (53).

1.9.2.3. Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimeraze (PCR-RFLP)

Ova metoda je modifikacija u kojoj je na PCR dodana, tzv. analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP). Amplificirani PCR produkti se podvrgavaju digestiji sa nekoliko restrikcijskih endonukleaza, te se tako dobiveni fragmenti odvajaju elektroforezom. Veličine fragmenata dobivene cijepanjem sa svakim od restrikcijskih enzima ukazuje na točkaste mutacije unutar *bla*_{TEM} ili *bla*_{SHV} gena (202).

1.9.2.4. Analiza konformacijskog polimorfizma jednolančane DNA nakon lančane reakcije polimeraze (PCR-SSCP)

Ova metoda se koristi za karakterizaciju SHV beta-laktamaza. Kratica SSCP dolazi od naziva single-strand conformational polymorphism (konformacijski polimorfizam jednolančane

DNA). Ovim postupkom se mogu detektirati pojedine mutacije na specifičnim lokacijama unutar *bla_{SHV}* gena. Korištenjem oligonukleotidnih početnica dobije se 475-bp amplimer koji se cijepa restriktivnim enzimom *Pst*I. Dobiveni dijelovi se denaturiraju i odjeljuju u 20% poliakrilamidnom gelu. Na taj način se mogu identificirati geni za SHV-1, -2, -3, -4, -5 i SHV-7 beta-laktamaze (203).

1.9.3. Uloga mikrobioloških laboratorija u detekciji ESBL-producirajućih izolata

Mikrobiološki laboratoriji igraju važnu ulogu u otkrivanju i hitnom izvještavanju o pojavi ESBL-producirajućih bakterija, jer podaci o osjetljivosti antibakterijskog lijeka su od najvažnijeg značaja za kliničare i zbrinjavanje pacijenata inficiranih ovim bakterijama (49). Dobar pristup laboratorijskoj praksi garantovao bi dobivanje korisnih i stručnih podataka o osjetljivosti/otpornosti mikroorganizama na testirane antimikrobne lijekove (42). To podrazumijeva stalno praćenje relevantnih publikacija, uvezivanje sa ostalim laboratorijama u državi i šire, i evaluaciju potencijalno korisnih testova za dijagnostiku u skladu sa svjetskim standardima (42). Važno je i uvezivanje laboratorija sa drugim centrima, prisutnost na domaćim i međunarodnim kongresima, i u stručnim društvima (42).

Sa laboratorijskog stajališta, smanjena osjetljivost ili pojava otpornosti na antibiotike proširenog spektra djelovanja, cefalosporine ili monobaktame, predstavlja prvi pokazatelj produkcije ESBL, ali potvrdni sinergijski testovi između klavulanata i odabranih beta-laktamskih antibiotika su nužni (49). Danas mnoge patogene bakterije pokazuju složenije mehanizme nego deceniju ili dvije prije (engl. reemerging pathogens) (42). Na primjer, ne postoje samo novi mehanizmi otpornosti, kao što je pojava ESBL-producirajućih izolata, nego i pojava multiplih beta-laktamaza kod istog bakterijskog soja (42). Na primjer, do 1990-ih, izolati *K. pneumoniae* koji inače produciraju SHV-1 beta-laktamazu, vremenom su stekli

mogućnost produkcije dviju beta-laktamaza (42), a današnji izolati *K. pneumoniae* mogu producirati tri do šest beta-laktamaza istovremeno (204).

Prema kriterijima CLSI, pozitivni ESBL-producirajući izolati podrazumijevaju i blago povećanje vrijednosti MIK za cefalosporine i aztreonam (49). Ovo je definirano za izolate *K. pneumoniae* i *E. coli*, i *P. mirabilis* ali nije utvrđeno i za ostale pripadnike porodice *Enterobacteriaceae* (49).

U skladu sa CLSI dva su kriterija korisna za detekciju ESBL (42). Prvi korak je skrining za određivanje smanjenja osjetljivosti nekih od preporučenih antibiotika (ceftriaxon, cefotaxim, ceftazidim, cefpodoxim, aztreonam) pomoću DDS (engl. double-disk synergy) testa (42). Drugo je uključivanje rutinskih, osjetljivih testova za potvrđivanje ESBL (E test) (42). Od prve pojave ESBL-producirajućih izolata, primjećeno je odstupanje u prevalenciji ovih bakterija među državama, te stalni monitoring prevalencije različitih tipova ESBL enzima, može doprinijeti definiranju širine problema u određenom geografskom području (49). Budući da su kliničke laboratorije prve pri susretu sa novim formama bakterija otpornih na antibiotike, potrebno je da imaju odgovarajuće instrumente za prepoznavanje ovih bakterija, uključujući obučeni kadar i aparaturu za njihovo praćenje (42).

Također, određivanje prisustva ESBL kod bakterijskih izolata je danas neophodno u svim kliničkim mikrobiološkim laboratorijima kako bi kliničari pravovremeno i uspješno liječili infekcije uzrokovane ovim bakterijama (175). Mjerodavnom kontrolom infekcije, je bitno prevenirati širenje i nastanak ESBL-producirajućih sojeva (122). U laboratorijama gdje specijalni testovi za detekciju ESBL nisu dostupni, preporučuju se osnovni dvostruki sinergistički disk test na osnovu kojeg ljekar može posumnjati na produkciju ESBL i ujedno razmotriti izbjegavanje liječenja sa lijekovima proširenog spektra djelovanja, cefalosporina ili aztreonama (122). Ako su do liječnika stigli pozitivni rezultati laboratorijskog skrininga na

ESBL, a zatim se poslije dokazalo da su bili negativni, izvještaj bi vodio ka nepotrebnom korištenju karbapenema (42).

Mnoge kliničke laboratorije nisu svjesne važnosti detekcije ESBL (42). Oskudica resursa u mikrobiološkim laboratorijama također može biti jedan od uzroka širenja ovih mehanizama otpornosti bakterija (205) što će dovesti do nemogućnosti prevencije širenja ovih patogena po cijelom svijetu (42).

2. HIPOTEZA

1. Pretpostavka istraživanja je da će zastupljenost ESBL producirajućih izolata biti veća u bolničkoj sredini u odnosu na izvanbolničku sredinu.
2. Očekuje se da će bolnički i izvanbolnički izolati producirati plazmidne AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze.
3. Očekuje se veća prevalencija zastupljenosti ESBL-producirajućih izolata kod populacije muškaraca u odnosu na populaciju žena.
4. Očekuje se veća prevalencija ESBL-producirajućih izolata u populacije koja je prethodno tretirana antibioticima, osobito cefalosporinima proširenog spektra.
5. Očekuje se također veća procentualna zastupljenost ESBL sojeva kod *Klebsiella* spp. i *E. coli* u odnosu na ostale Enterobacteriaceae.
6. Očekuje se klonska srodnost ESBL-producirajućih izolata u bolničke i izvanbolničkoj sredine.

3. CILJEVI RADA

1. Utvrditi zastupljenost izvanbolničkih i bolničkih ESBL-producirajućih izolata.
2. Odrediti distribuciju ESBL-producirajućih izolata prema spolu i dobi, kako u bolničkoj tako i u izvanbolničkoj sredini.
3. Odrediti distribuciju ESBL-producirajućih izolata po odjelima, te vrsti bolesničkog materijala.
4. Ispitati osjetljivost/otpornost izolata na pojedine antibiotike.
5. Tipizirati ESBL, AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze PCRom i sekvenciranjem bla gena.
6. Utvrditi klonsku srodnost metodom PFGE.
7. Utvrditi prevalenciju i tipove plazmidnih-AmpC beta-laktamazama multiplex PCR-om.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Definicija (tip) istraživanja, ispitanici

Istraživanje je sprovedeno u dva dijela: retrospektivno i prospektivno.

Bakterijski izolati i podaci o uzorcima za retrospektivni dio istraživanja su prikupljeni iz protokola Mikrobiološkog laboratorija Službe za mikrobiologiju, kao i iz historija bolesti pacijenata sa različitih odjela Kantonalne bolnice Zenica (Bosna i Hercegovina).

U drugom dijelu istraživanja, tj. u prospektivnom dijelu, su sakupljeni svi (neponavljajući) gram-negativni bakterijski izolati pacijenata kod kojih je izoliran gram-negativni bakterijski uzročnik iz različitih infekcija i iz različitih bolničkih odjela, uključujući i vanbolničke pacijente, u Kantonalnoj bolnici Zenica (Bosna i Hercegovina). Podaci za sve pacijente su uneseni u specijalno dizajniran upitnik.

Za konačnu analizu su korišteni klinički izolati gram-negativnih bakterija koje su proizvodili beta-laktamaze širokog spektra (ESBL) dobijeni iz različitog kliničkog materijala (po jedan izolat od jednog pacijenta). Molekularne analizirane su izvršene u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju, Kliničkog bolničkog centra Rebro, Zagreb (Hrvatska).

4.2. Vrijeme istraživanja

Istraživanje je obuhvatilo dva perioda: retrospektivni dio i prospektivni od 01. 12. 2009. godine do 31. 04. 2010. godine.

4.3. Metode korištene za prikupljanje podataka o pacijentima

Svi podaci o pacijentima su uneseni u posebno pripremljen upitnik.

Upitnik je sadržavao sljedeće podatke: vrsta kliničkog materijala, datum uzorkovanja, broj protokola, dob, spol, broj dana hospitalizacije, zanimanje, mjesto stanovanja, boravak prije prijema u bolnicu (kod kuće, u drugoj bolnici, u staračkom domu/domu za nezbrinutu djecu, na drugom odjelu), prethodni boravak u bolnici (odjel kod prethodnog boravka), operativni zahvat kod prethodnog boravka u bolnici, kontakt s osobama koje su boravile u bolnici, bolnički odjel

u trenutku istraživanja, dijagnoze, operativni zahvat u vrijeme istraživanja, izolirani uzročnik, korišteni antibiotici u posljednjih dvanaest mjeseci (vrsta antibiotika), upotreba kortikosteroida, rezultati antibiograma o osjetljivosti/otpornosti uzročnika na pojedine antibiotike.

4.3. Mikrobiološke metode

Klinički materijal je inokuliran na krvni (5%) Columbia agar base i McConkey agar (Oxoid, Basingstoke, UK), koji je inkubiran preko noći u termostatu na 37 °C.

Gram-negativni izolati su identificirani standardnim mikrobiološkim metodama, a biohemijskim testovima je određena njihova pripadnost određenoj vrsti (206). Izolati su pohranjeni u dubokom agaru (agar, pepton, mesni ekstrakt, NaCl, destilovana voda) do daljnjeg testiranja.

4.3.1. Određivanje osjetljivosti/otpornosti na antimikrobne lijekove

Antimikrobna osjetljivost/otpornost je testirana disk-difuzijskom metodom (Kirby-Bauer) na Mueller-Hinton agaru (207) u skladu sa Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI standardima) (42). Kao kontrolni sojevi korištene su *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL-pozitivan soj) i *E. coli* ATCC 25922 (ESBL negativan soj). Sojevi su testirani na: amoksicilin (20 µg) (AMX); amoksicilin+klavulanska kiselina (20/10 µg) (AMC); cefaleksin (30 µg) (CN); cefuroksim (30 µg) (CXM); cefotaksim (30 µg) (CTX); ceftriakson (30 µg) (CRO); ceftazidim (30 µg) (CAZ); cefepim (30 µg) (FEP); imipenem (10 µg) (IMIP); gentamicin (10 µg) (GEN); amikacin (30 µg) (AM); tetraciklin (30 µg) (TET); ciprofloksacin (5 µg) (CIP); sulfometoksazol-trimetoprim (1,25/23,75 µg) (SXT); nitrofurantoin (300 µg) (F/M); norfoksacin (10 µg) (NOR); loracarbef (30 µg) (LVX); cefiksim (5 µg) (CFM).

4.3.2. Disk-difuzijski test

U rutinskom bakteriološkom laboratoriju obično se primjenjuje disk-difuzijska metoda. Suspenzija testiranog soja se nanosi pomoću brisa na površinu Mueller-Hinton agara na koji se zatim nanose diskovi s antibioticima pomoću dispenzera ili pincete. Suspenziju soja

pripremamo tako da pokupimo bakteriološkom ušicom 3 do 5 kolonija s površine krute hranjive podloge, razmutimo ih u fiziološkoj otopini (5ml) i mućkamo uz pomoć vortexa da se dobije homogena suspenzija. Gustoću suspenzije podešavamo prema standardnoj Mc Farland suspenziji 0.5. Antibiotik iz diska difundira po površini agara tako da se stvara gradijent koncentracija i na određenoj udaljenosti od ruba diska ovisno o osjetljivosti soja on prestaje rasti. Promjer inhibicijske zone mjerimo ravnalom i izražavamo ga u mm. Na osnovu širine inhibicijske zone određuje se da li je ispitivani soj osjetljiv, umjereno osjetljiv ili rezistentan. Osjetljivost označavamo s tri križa ili brojkom tri, umjerenu osjetljivost s dva križa ili brojkom 2 a rezistenciju s brojkom 0. Odabir antibiotika ovisi o vrsti bakterije koju testiramo i težini infekcije. Potrebno je obratiti pažnju na standardiziranje veličine inokuluma. Ukoliko je suspenzija bila pregusta dobiti ćemo lažno manje inhibicijske zone a ako je previše rijetka onda će zone biti lažno veće nego što bi trebale biti. Također je važno da diskovi budu dovoljno udaljeni jedan od drugoga i od ruba ploče da bi mogli pravilno izmjeriti promjer inhibicijske zone. Debljina agara bi trebala iznositi 4 mm (42, 64).

4.3.3. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najniža koncentracija antibiotika koja sprečava umnožavanje testiranog soja a može se određivati bujonskom dilucijskom metodom ili agar dilucijskim testom (42, 64).

Indikacije za izvođenje MIK-ova:

1. Testiranje bakterija koje rastu sporo ili za rast trebaju posebne dodatke te anaerobnih bakterija;
2. Ako postoji potreba preciznog određivanja osjetljivosti bakterije npr. kod teških infekcija kada se primjenjuju toksični antibiotici s malom terapijskom širinom npr. Aminoglikozidi;

3. Određivanje osjetljivosti bakterija kod kojih disk-difuzijska metoda daje nepouzdana rezultate kao što je npr. penicilin rezistentni pneumokok iz hemokulture ili likvora.

4.3.3.1. Bujonska dilucijska metoda

4.3.3.1.1. Pripremanja razrijeđenja antibiotika

Raspon koncentracija antibiotika ovisi o vrsti antibiotika, testiranom organizmu i mjestu infekcije. Raspon mora obuhvaćati koncentracije antibiotika za tri razrijeđenja više i tri razrijeđenja niže od zadanih NCCLS prijelomnih točaka kao bi se organizam mogao interpretirati kao osjetljiv, intermedijaran ili rezistentan. Dilucijska metoda se izvodi u standardiziranoj podlozi tj. Mueller-Hinton bujonu. Dilucija u bujonu obuhvaća makrodiluciju pri čemu se koriste volumeni bujona veći od 1 ml (obično 2 ml) otpipetiranih u epruvete, te mikrodiluciju koja koristi volumene manje od 0.1 ml a sadržani su u bunarićima mikrotitracijskim pločica. Stock solucije antibiotika se obično priređuju u koncentraciji od 5120 µg/ml. Antibiotik se uvijek razrijeđuje 1:9 (1 ml antibiotika i 9 ml Mueller-Hinton bujona ili nekog drugog bujona). Na taj način se dobiva početna koncentracija od 512 µg/ml. Od te koncentracije se počinje sa serijskim razrijeđenjima. Ako se testiraju rezistentne bakterije kod kojih se očekuju visoki MIK-ovi razrijeđenje se može prilagoditi tako da se dobije više početna koncentracije npr. 1024 ili 2048 µg/ml. Potrebno je pripremiti 12 sterilnih epruveta. U prvu epruvetu se pipetira 1 ml bujona i ml antibiotika. U drugu epruvetu pipetiramo 2 ml bujona i 1 ml antibiotika. U treću epruvetu stavljamo 7 ml bujona i 1 ml antibiotika.

- | | |
|--|-----------|
| 1. epruveta: 1 ml MH + 1ml atb | 256 µg/ml |
| 2. epruveta: 3 ml MH + 1ml atb | 128 µg/ml |
| 3. epruveta: 7 ml MH + 1 ml atb | 64 µg/ml |
| 4. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete | 32 µg/ml |
| 5. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete | 16 µg/ml |

6. epruveta: 7 ml MH + 1 ml iz 3. epruvete 8 µg/ml
7. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 4 µg/ml
8. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 2 µg/ml
9. epruveta: 7 ml MH + 1 ml iz 6. epruvete 1 µg/ml
10. epruveta: 1 ml MH + 1 ml iz 9. epruvete 0.5 µg/ml
11. epruveta: 3 ml MH + 1 ml iz 9. epruvete 0.25 µg/ml

Razrijeđenja antibiotika se ukapavaju pomoću mikropipete u okomite stupce u mikrotitar pločicama u količini od 50 µl u svaku jažicu. U prvi stupac se stavlja samo bujon bez antibiotika radi kontrole rasta soja (42, 64).

4.3.3.1.2. Pripremanje inokuluma

Kod Enterobakterija i nonfermentora se preporučuje pripremanje inokuluma iz bujonske kulture. Testirani soj se zasijava u 3 ml Mueller-Hinton bujona i inkubira preko noći na 35 do 37°C. Prekonoćna kultura obično sadržava 10^9 do 10^{10} CFU/ml. Ona se zatim razrijeđuje tako da se prenaša 100 µl kulture u 9.9 ml fiziološke otopine pa se dobije razrijeđenje od 10^8 CFU/ml koja bi trebalo odgovarati Mc Farland suspenziji 0.5. Od tog razrijeđenja se uzima 100 µl i prenaša u 9.9 ml Mueller-Hinton bujona tako da se dobije veličina inokuluma od 10^6 CFU/ml. 50 µl takovog razrijeđenja se zatim nanosi pomoću stepera u jažice u mikrotitar pločicama u kojima se već nalazi 50 µl razrijeđenja antibiotika tako da se dobije konačna veličina inokuluma od 5×10^5 CFU /ml. Budući da u svakoj jažici na 50 µl antibiotika dolazi 50 µl soja ukapane koncentracije antibiotika se razrijeđuju još na pla. Time se dobivaju konačne koncentracije antibiotika 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 i 0.12 µg/ml. Mikrotitar pločice se zatim inkubiraju 18 do 24 h na 35 do 37°C u termostatu. Mikrodilucijske pločice treba inokulirati unutar 30 min od pripreme inokuluma. Uzorak soja razrijeđenog za kapanje treba dodatno razrijediti 1:100 i 1:1000 i 100 µl od svakog razrijeđenja zasijati na

krutu podlogu radi provjere veličine inokuluma. Jažica s inokulumom ali bez antibiotika se supkultivira radi provjere rasta i čistoće kulture. Nakon inokulacije svaka pločica se zatvara sterilnim poklopcem ili samoljepljivom tapetom da bi se spriječio sušenje tokom inkubacije. Pločice se inkubiraju na 35°C 18 do 20 sati. Termostat mora biti odgovarajuće vlažnosti kako bi se izbjeglo sušenje pločice i kondenzacija koja može dovesti do kontaminacije. Za detekciju vankomicin rezistentnih enterokoka i meticilin rezistentnih stafilokoka preporučuje se inkubacija punih 24 sata.

Kod streptokoka i *Haemophilusa* razrijeđenje soja se priprema direktno suspendiranjem kolonija s krute hranjive podloge u odgovarajući bujon koji se dalje ne razrijeđuje.

4.3.3.1.3. Interpretacija rezultata

Ukoliko je došlo do zamućenja bujona u jažicama to znači da koncentracija antibiotika nije bila dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija. Ako je bujon ostao bistar to znači da je koncentracija antibiotika dovoljno visoka da spriječi umnožavanje bakterija u jažicama. Da bi odredili MIK testiranog soja moramo pronaći prvu jažicu u nizu u kojoj je bujon ostao bistar. Koncentracija antibiotika u toj jažici odgovara MIK-u testiranog soja. Kod gram-pozitivnih bakterija problem u očitavanju MIK-a može nastati zbog neoštre razlike u zamućenju između jažica u kojima soj raste i onih u kojima nema porasta (hazy endpoints). Postoje različite optičke naprave koje olakšavaju očitavanje zamućenja. Najjednostavniji način je čitanje konkavnim zrcalom koje povećava sliku (42, 64).

4.3.4. Testovi za dokaz produkcije beta-laktamaza proširenog spektra (ESBL)

Detekcija ESBL se uglavnom vrši za izolate *K. pneumoniae* i *E. coli* iako se one ponekad mogu pojaviti i kod ostalih enterobakterija i čak kod nonfermentora. Svi fenotipski testovi za detekciju ESBL se baziraju na sinergizmu cefalosporina proširenog spektra i aztreonama s

klavulanskom kiselinom i zbog toga ne otkrivaju AmpC β -laktamaze proširenog spektra koje najčešće nisu inhibirane klavulanatom (64).

Test koji se najčešće provodi u rutinskim laboratorijima je dvostruki-disk sinergistički test.

4.3.4.1. Dvostruki disk-sinergistički test

Testirani soj suspendiramo u fiziološkoj otopini na jednaki način kao za antibiogram i sterilnim brisom ga nanesimo na površinu Mueller-Hinton agara. U sredinu se stavlja disk koji sadržava amoksisilin kombiniran s klavulanskom kiselinom a na udaljenost od 2 do 3 cm se stavljaju diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaskona i aztreonama. Optimalna udaljenost između cefalosporinskog i centralnog diska ovisi o soju, stupnju njegove rezistencije i količini β -laktamaze koji proizvodi. Ploče se zatim inkubiraju 18 do 24 h na 37° i zatim se očitava rezultat. Ako dođe do širenja inhibicijske zone oko cefalosporina ili aztreonama u smjeru prema centralnom disku to se smatra pozitivnim rezultatom testa. Prednost testa je njegova jednostavnost a nedostatak je subjektivnost u čitanju rezultata. Neki autori preporučuju upotrebu cefpodoksimskog diska umjesto gore navedenih jer on uspješno detektira ESBL iz sve tri porodice: TEM, SHV i CTX- M (64).

4.3.4.2. Disk na disk test

Soj se nanosi na Mueller-Hinton agar na jednaki način kao za dvostruki disk-sinergistički test i na površinu agara se nanose diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama. Na navedene diskove se stavlja disk ko-amoksiklava kao izvor klavulanske kiseline. Povećanje promjera zone inhibicije za najmanje 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču koja sadržava samo cefalosporinske diskove bez ko-amoksiklava je dokaz produkcije ESBL (64).

4.3.4.3. Inhibitorom potencirani disk-difuzijski test

Za taj test je potrebno pripremiti Mueller-Hinton agar s inkorporiranom klavulanskom kiselinom. Klavulansku kiselinu dodajemo u koncentraciji od 4 mg/L u podlogu koja mora biti prethodno ohlađena na 55 °C. Kontrolna ploča ne sadržava klavulanat. Testirani soj se zasijava na ploču s klavulanskom kiselinom i na ploču bez inkorporirane klavulanske kiseline. Na ploče se postavljaju diskovi cefalosporina (ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson) i aztreonama i mjere se zone inhibicije na ploči s klavulanatom i na ploči bez klavulanata. Dokaz produkcije ESBL je povećanje zone inhibicije rasta oko cefalosporinskog diska za najmanje 10 mm na ploči s klavulanskom kiselinom u odnosu na kontrolnu ploču (64).

4.3.4.4. E-test-ESBL

Testirani soj se suspendira u fiziološkoj otopini kao što je opisano za izradu antibiograma i nanosi se sterilnim brisom na MH agar. Na ploču se zatim postavlja E test traka koja s jedne strane ima gradijent koncentracija za ceftazidim a s druge strane ceftazidim u kombinaciji s klavulanskom kiselinom. Interpretacija rezultata se vrši prema uputama proizvođača (64).

4.3.5. Detekcija *bla*_{ESBL} gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Detekcija SHV, TEM, CTX-M, PER i AmpC beta-laktamazama učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom. Prikaz početnica, protokola i očekivane veličine PCR produkta za PCR reakcije prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Primeri korišteni za detekciju specifičnih gena

<i>bla</i> gen	Početnica	Redoslijed sekvenci	Protokol PCR reakcije	Očekivana veličina produkta
TEM*	OT-3 OT-4	5'-ATG-AGT-ATT-CAA-CAT-TTC-CG-3' 5'-CCA-ATG-CTT-AAT-CAG-TGA-GG-3'	58°C	850 bp
CTX-M*		SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA CCG CRA TAT CRT TGG TGG TG	94°C 94°C 60°C 72°C 72°C	543 bp
<i>bla</i> gen	Početnica	Redoslijed sekvenci	Protokol PCR reakcije	Očekivana veličina produkta
CTX-M-1*	CTX-M-1grF CTX-M-1grF	CCC ATG GTT AAA AAA TCA CTG CCG TTT CCG CTA TTA CAA AC	94°C 94°C 55°C 72°C 72°C	891 bp
SHV*	SHV-F SHV-R	GCC GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC ATG CCG CCG CCA GTC A	94°C 94°C 68°C 72°C 72°C	1007 bp
AmpC [†]	MOX-M-F MOX-M-R	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	95°C 94°C 64°C 72°C 72°C	520 bp
	CIT-M-F CIT-M-R	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	95°C 94°C 64°C 72°C 72°C	462 bp
	DHA-M-F DHA-M-R	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	95°C 94°C 64°C 72°C 72°C	405 bp
	FOX-M-F FOX-M-R	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	95°C 94°C 64°C 72°C 72°C	190 bp

<i>bla</i> gen	Početnica	Redoslijed sekvenci	Protokol PCR reakcije	Očekivana veličina produkta
PER*	PER-EXT-1-F PER-EXT-1-R	5'-GGG-ACA-R-TC-SKA-TGA-ATG-TCA-3' 5'-GGG-YSG-CTT-AGA-TAG-TGC-TGA-T-3'	52°C	966 bp
VIM‡	VIM-1-F VIM-1-R	5'-CAG-ATT-GCC-GAT-GGT-GGT-TGG-3' (Y=C/T) 5'-AGG-TGG-GCC-ATT-CAG-CCA-GA-3' (M=A/C)	55°C	523 bp
IMP§	IMP-A IMP-B	5'-GAA-GGY-GTT-TAT-GTT-CAT-AC-3' 5'-GTA-MGT-TTC-AAG-AGT-GAT-GC-3'	55°C	350 bp
NDM	NDM-F NDM-R	5'-AAT-GGA-ATT-GCC-CAA-TAT-TAT-GC-3' 5'-CGA-AAG-TCA-GGC-TGT-GTT-GC-3'	58°C	264 bp
OXA¶	OXA-23F OXA-23R	5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3' 5'-TCACAACAACATAAAAGCACTG-3'	94°C	1,058 bp
			94°C 52°C 72°C 72°C	
	OXA-24F OXA-24R	5'-GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3' 5'-TTCCCCTAACATGAATTTGT-3'	94°C 94°C 50°C 72°C 72°C	1,023 bp
	OXA-51F OXA-51R	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	94°C 94°C 55°C 72°C 72°C	353 bp
	OXA-58F OXA-58R	5'-CGATCAGAATGTTCAAGCGC-3' 5'-ACGATTCTCCCCTCTGCGC-3'	94°C 94°C 50°C 72°C 72°C	972 bp
	ISAbal F ISAbal R	5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' 5'-CGACGAATACTATGACAC-3'	94°C 94°C 54°C 72°C 72°C	900 bp

*

Izvor: Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF. Development of a Multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherchia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. J Clin Microbiol 2005;43(9):4486-91 (208).

† Izvor: Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A and Arlet G. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol. Lett. 2002;209:161-68 (209).

[‡]Izvor: Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*VIM a new integron borne metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1584-90 (210).

[§]Izvor: Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3(2):117-27 (211).

[¶]Izvor: Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore D. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Ag* 2006;27(4):351-3 (212).

Reakcije su izvedene na aparatu GenAmp PCR system 9600. Pročišćavanje PCR produkta učinjeno je primjenom komercijalnog kita QUIAquick PCR purification Kit (Quiagen). Pročišćeni PCR produkt može se skladištiti na -20 °C. Pročišćeni PCR produkt amplificira se uz primjenu ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, koji sadrži dNTP, pufer, polimerazu i označene ddNTP (Applied Biosystems). Dalje se sekvencijski produkt pročišćava upotrebljavajući DyeEx.O Spin Kit (Qiagen). Dalje slijedi sekvencijska kapilarna elektroforeza koja se izvodi na ABI 3100 Avant Genetic Analyzer aparatu (Applied Biosystems), MACROGEN, Koreja. Nakon kapilarne sekvencijske reakcije rezultat predstavlja kromatograf, odnosno kromatografska krivulja na kojoj su vidljivi pikovi u četiri različite boje koji predstavljaju po jedan nukleotid. Rezultat u obliku sekvencijskog slijeda moguće je eksportirati u Fasta tekstualnom formatu. Dobivene sekvence unose se u on-line interaktivnu bazu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.3.6. Elektroforeza u pulzirajućem polju (PFGE)

U svrhu utvrđivanja epidemiološke povezanosti između pojedinih izolata, napravljena je analiza PFGE (engl., pulsed-field gel electrophoresis) na reprezentativnim uzorcima koji su producirali ESBL.

4.3.6.1. Izolacija i uzgoj bakterijskog soja za PFGE

Nakon postupka uzgoja i identifikacije sojevi su nasadeni na kruti hranjivi medij krvi. Porasli premonoćni soj prenešen je iz pojedinačne kolonije u 5 ml tekućeg hranjivog medija ekstrakta

mozga i srca (BH) prema modificiranoj metodi *Kaufman ME* (213). Sojevi su inkubirani preko noći uz miješanje na optimalnoj temperaturi (37° C) do kasne logaritamske faze, odnosno do koncentracije stanica 4 MecFarlanda. Po 1,0 ml prekonoćne stanične kulture je centrifugirano a stanice su taložene (2 minute pri 10.000xg) i isprane u 1 ml pufera SE (75mM NaCl; 25mM EDTA Na₂).

4.3.6.2. Uklapanje bakterija u agarozu

Stanice su taložene te resuspendirane u 500 µl pufera SE. U SE-staničnu suspenziju dodano je 10 µl lizozima. Odmah je dodano 500 µl 2,0 % agaroze LGP otopljene u SE puferu (temperirane na 55° C) i kratko promješano. Po 100 µl takve stanično-agarozne suspenzije brzo je otpipetirano u kalupe za formiranje blokova agaroze te ostavljeno 10 minuta na sobnoj temperaturi da se agarozna skrutne i da započne djelovanje lizozima. Blokovi agaroze su prenešeni u 2 ml pufera ESP (1% N-lauril sarcosine; 0,5 M EDTA Na₂, pH 9,5; 500 ug/ml proteinaza K) te inkubirani na 56° C preko noći. Nakon toga, blokovi agaroze su inkubirani u 2 ml PMSF-a, 2 sata, na sobnoj temperaturi. Blokovi agaroze su isprani 3 puta u 5 ml pufera TE (po 30 minuta na +4° C) (213).

4.3.6.3. Cijepanje kromosomske DNA pomoću restrikcijske endonukleaze *XbaI*

Blokovi agaroze su ekvilibrirani u 1 X restrikcijskom puferu (30 minuta). Smjesa za cijepanje (200 µl) sadrži:

- blok agaroze s pročišćenom kromosomskom DNA;
- 2 µl enzima *XbaI* (10 jedinica enzima / 1 µl);
- 20 µl odgovarajućeg pufera (10x) za restrikcijski enzim i
- 178 µl vode.

Blokovi agaroze su inkubirani na temperaturi 37 C, 3 sata.

4.3.6.4. Odjeljivanje pocijepanih dijelova kromosomske DNA pomoću EPP

Pripremljen je 1%-tni gel agaroze (EPP agaroz) u puferu 0,5xTBE. (44,5mM Tris base; 44,5 mM borna kiselina i 1 mM EDTA Na₂, pH 8,0 do 8,5). Korišten je molekularni standard (lambda konkatamer). U pufer 0,5xTBE (*prethodno ohlađen na 10° C*) dodana je tiourea (50 mM). Korišteni PFGE uvjeti za *Kl. pneumoniae* su: 5-50 sekundi; 6,0 V/cm; 120°; 19 sati (213).

4.3.6.5. Dokumentiranje i interpretiranje rezultata

Po završetku elektroforeze gel je standardno obojen otopinom etidijevog bromida (1 µg/ml, 30 minuta) te odbojen u destiliranoj vodi. Gel s obojenim DNA vrpčama je fotografiran uz osvjetljenje na UV transiluminatoru (254 nm). Koristeći računalni program *GelComparII* pomoću dendograma je prikazan postotak sličnosti između pojedinih bakterijskih sojeva (uz Dice-ov korelacijski koeficijent). EPP genotipovi (podtipovi) su određeni prema sličnosti odijeljenih profila DNA između istih bakterijskih vrsta. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost 80% i veća smatraju se genetski povezanim izolatima (213).

4.4. Statističke metode

U ovoj studiji praćenja su bile korištene metode deskriptivne (grupisanje, tabeliranje, grafičko prikazivanje, izračunavanje mjera centralne tendencije, mjera varijabiliteta i relativnih brojeva) i analitičke statistike (metode za testiranje prirode raspodjele), nekih od odgovarajućih testova neparametarske statistike za testiranje značajnosti razlike i povezanosti praćenih varijabli (χ^2 - test, precizno prema prirodi prikupljenih podataka i njihovoj raspodjeli). Statistički značajna je ona vrijednost testova ukoliko je $p < 0,05$. Podaci su upoređivani u odnosu na grupe bolnički/vanbolnički i ESBL/Non-ESBL. Unutar navedenih

grupa upoređivani su podaci vezani za odjel kod bolničkih pacijenata, odnosno općinu stanovanja kod vanbolničkih pacijenata, dob, spol, porijeklo uzorka bolnički/vanbolnički, te izolirani uzročnik; upoređivana je prevalencija antimikrobne otpornosti u odnosu na vrstu infekcije, ESBL/Non-ESBL, te zastupljenost beta-laktamaza širokog i proširenog spektra djelovanja, plazmidnih AmpC beta-laktamaza, metalobeta-laktamaza i oksacilinaza.

5. REZULTATI

5.1. PRVI DIO ISTRAŽIVANJA

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine ukupno je analizirano 9092 različita uzorka dobijena od bolničkih pacijenata, od čega je najviše uzoraka bilo sa internističkog, 2954 (32,5%), infektološkog, 2492 (27,4%) i dječijeg odjela 1826 (20%). Broj analiziranih uzoraka sa drugih bolničkih odjela se kretao od 198 do 575 (2,1%, odnosno 6,3%) ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Od ukupno analiziranih 9092 različita uzorka bolničkih pacijenata, pozitivnih je bilo 1722 (18,9%). Prevalenca zastupljenosti pozitivnih uzoraka u odnosu na broj analiziranih uzoraka na pojedinim bolničkim odjelima (specifična stopa pozitivnosti prema bolničkim odjelima) se kretao od najmanje 9,0% (18 od 198) na odjelu ginekologije, do najviše 54,3% (313 od 575) na odjelu kirurgije.

Gram-negativne bakterije su izolirane iz 1254 (72,7%) od ukupno 1722 pozitivna bolnička uzorka. Gram-negativne bakterije su prevladavale kao uzročnici infekcija na svim bolničkim odjelima u odnosu na ostale uzročnike, od 62,5% do 92,9% (196 od 313, odnosno 69 od 74) na odjelima kirurgije i fizijatrije.

Od ukupno 1254 gram-negativne bakterije izolirane iz kliničkog materijala sa različitih bolničkih odjela, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane u 126 (10,0%) uzoraka.

Najveći broj ESBL-producirajućih bakterija od ukupno 1254 izolirane gram-negativne bakterije izoliran je na odjelu kirurgije, 54 (27,6%).

Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija zabilježena je na odjelu kirurgije, 27,6% (54 ESBL od 196 gram-negativnih izolata), a na ostalim odjelima se

prevalencija kretala od najmanje 2,4% (4 ESBL od 169 gram-negativnih izolata) na odjelu infektologije do 20,0% (5 ESBL od 25 gram-negativnih izolata) na odjelu onkologije ($p < 0,001$; RR=0,7818) (Tabela 4).

Relativni rizik oboljevanja je povećan 0,7818 puta kod bolničkih pacijenata u odnosu na vanbolničke pacijente (Tabela 5).

Tabela 4. Distribucija analiziranih i pozitivnih uzoraka kliničkog materijala kod bolničkih pacijenata

Odjeljenje	Broj (%) pacijenata				
	Ukupan broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj pozitivnih uzoraka	Gram negativne bakterije		
			Ukupno	ESBL	Non-ESBL
Hirurgija i dječija hirurgija	575 (6,3)	313 (54,3)	196 (62,5)	54 (27,6)	142 (72,4)
Interno	2954 (32,5)	404 (13,6)	317 (78,4)	18 (5,7)	299 (94,3)
Pedijatrija, dječije TBC	1826 (20,0)	478 (26,2)	338 (70,6)	27 (8,0)	311 (92,0)
Infektivno	2492 (27,4)	247 (9,9)	169 (68,3)	4 (2,4)	165 (97,6)
Fizijatrija	340 (3,7)	74 (21,8)	69 (92,9)	4 (5,8)	65 (94,2)
Neurologija	502 (5,5)	151 (30,1)	127 (84,1)	14 (11,0)	113 (89,0)
Onkologija	205 (2,2)	37 (17,9)	25 (67,3)	5 (20,0)	20 (80,0)
Ginekologija	198 (2,1)	18 (9,0)	13 (70,8)	1 (7,7)	12 (92,3)
Ukupno	9092 (100,0)	1722 (18,9)	1254 (72,7)	126 (10,0)	1127 (89,9)

(RR=0,7818; p<0,001)

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine u Službi za mikrobiologiju Kantonalne bolnice Zenica ukupno je analizirano 16037 različitih uzoraka dobijenih od vanbolničkih pacijenata, od čega je najviše uzoraka bilo iz općine Zenica, 8460 (52,7 %) ($p < 0,001$) (Tabela 5).

Od ukupno analiziranih 16037 različitih uzoraka vanbolničkih pacijenata, pozitivnih je bilo 3532 (22,0%).

Prevalenca zastupljenosti pozitivnih uzoraka u odnosu na broj analiziranih uzoraka iz pojedinih općina Zeničko-dobojskog kantona se kretao od najmanje 9,2% (136 od 1476) iz Žepča, do najviše 56,9% (375 od 659) iz Visokog.

Gram-negativne bakterije su izolirane iz 2857 (80,9%) od ukupno 3532 pozitivna uzorka vanbolničkih pacijenata.

Gram-negativne bakterije su prevladavale kao uzročnici infekcija (>50%) na svim općinama osim u Maglaju, 45,1% (23 od 51) u odnosu na ostale uzročnike.

Od ukupno 2857 gram-negativnih bakterija izoliranih iz različitih uzoraka vanbolničkih pacijenata, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane iz 184 (6,4%) uzorka.

Najveći broj ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na ukupno 184 je izolirano u vanbolničkih pacijenata iz općine Zenica, 101 (54,9%).

Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija po općinama Zeničko-Dobojskog kantona je zabilježena u općini Žepče, 7,9% (8 ESBL od 101 gram-negativnih izolata) ($RR=0,7537$; $p < 0,001$), a u ostalim općinama se prevalencija kretala od najmanje 4,0% (17 ESBL od 429 gram-negativnih izolata) u općini Kakanj do 7,3% (101 ESBL od 1375 gram-negativnih izolata) u općini Zenica (Tabela 5). Relativni rizik oboljevanja je

povećan za 0,7537 puta kod vanbolničkih pacijenata u odnosu na bolničke pacijente (Tabela 4).

Tabela 4. Distribucija analiziranih i pozitivnih uzoraka kliničkog materijala kod vanbolničkih pacijenata

Općina	Broj (%) pacijenata				
	Ukupan broj analiziranih uzoraka	Ukupan broj pozitivnih uzoraka	Gram-negativne bakterije		
			Ukupno	ESBL	Non-ESBL
Zenica	8460 (52,7)	1683 (19,9)	1375 (81,7)	101 (7,3)	1274 (92,7)
Zavidovići	2592 (16,2)	495 (19,1)	391 (79,0)	28 (7,2)	363 (92,8)
Žepče	1476 (9,2)	136 (9,2)	101 (74,3)	8 (7,9)	93 (92,1)
Kakanj	1515 (9,4)	517 (34,1)	429 (83,0)	17 (4,0)	412 (96,0)
Visoko	659 (4,2)	375 (56,9)	322 (85,9)	16 (5,0)	306 (95,0)
Vareš	451 (2,8)	142 (31,5)	112 (78,9)	8 (7,1)	104 (92,9)
Breza	607 (3,8)	133 (21,9)	104 (78,2)	5 (4,8)	99 (95,2)
Maglaj	277 (1,7)	51 (18,4)	23 (45,1)	1 (4,3)	22 (95,7)
Ukupno	16037 (100,0)	3532 (22,0)	2857 (80,9)	184 (6,4)	2673 (93,6)

(RR=0,7537; p<0,001)

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine ukupno je analizirano 9092 različita uzorka bolničkih pacijenata, od čega je najviše analizirano uzoraka mokraće, 3284 (36,1%), briseva respiratornog trakta, 2908 (32,0%), koprokulture, 1070 (11,8), hemokulture, 709 (7,8), infekcije kože i mekih tkiva - uključujući i bris pupka novorođenčadi, 283 (3,1%), kirurških rana 206 (2,3%) i briseva stome, tubusa i kanile, 145 (1,6%). Broj ostalih uzoraka se kretao od 40 do 145 (0,4%, odnosno 1,6%) ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Od ukupno analiziranih 9092 različita uzorka bolničkih pacijenata, ukupno je bilo pozitivnih 1568 (17,2%) uzoraka. Prevalenca zastupljenosti pozitivnih izolata u odnosu na vrstu kliničkog materijala se kretao od najmanje 6,7% (194 od 2908) u uzorcima respiratornog trakta, do najviše 65,5% (135 od 206) kirurških rana.

Gram-negativne bakterije su izolirane iz 1254 (80,0%) od ukupno 1568 pozitivnih bolničkih uzoraka. Gram-negativne bakterije su prevladavale kao uzročnici infekcija u svim vrstama kliničkog materijala, od 20,0% do 91,6% (6 od 30, odnosno 824 od 900) kod opekotina odnosno uzoraka mokraće.

Od ukupno 1254 gram-negativnih bakterija izoliranih iz različitih vrsta kliničkog materijala, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane iz 126 (10,0%) uzoraka.

Najveći broj ESBL-producirajućih bakterija, od ukupno 126 gram-negativne ESBL-producirajuće bakterije, je izoliran iz uzoraka mokraće, 37 (29,4%).

Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija prema vrsti kliničkog materijala zabilježena je u uzorcima opekotina, 83,3% (5 ESBL od 6 gram-negativnih izolata), a u ostalim uzorcima se prevalenca kretala od 0% (0 ESBL od 5 gram-negativnih izolata) u brisevima oka do 50,0% (4 ESBL od 8 gram-negativnih izolata) u uzorcima aspirata i punktata ($RR=0,7710$; $p < 0,001$) (Tabela 6). Relativni rizik oboljevanja je bio povećan 0,7710 puta kod bolničkih pacijenata u odnosu na vanbolničke pacijente (Tabela 7).

Tabela 6. Distribucija analiziranih i pozitivnih uzoraka različitog kliničkog materijala kod bolničkih pacijenata

Vrsta kliničkog materijala	Broj (%) pacijenata				
	Ukupan broj pregledanih uzoraka	Ukupan broj pozitivnih uzoraka	Ukupan broj Gram-negativnih izolata	ESBL	Non-ESBL
Kirurška rana	206 (2,3)	135 (65,5)	74 (54,8)	35 (47,3)	40 (54,1)
Aspirat,punktat	91 (1,0)	21 (23,1)	8 (38,1)	4 (50,0)	4 (50,0)
Bris katetera	140 (1,5)	43 (30,7)	24 (55,8)	2 (8,3)	22 (91,7)
Bris tubusa, kanile, stome	145 (1,6)	44 (30,3)	37 (84,1)	14 (37,8)	22 (59,5)
Koža, bris pupka	283 (3,1)	149 (52,7)	64 (43,0)	15 (23,4)	49 (76,6)
Opekotina	59 (0,6)	30 (50,8)	6 (20,0)	5 (83,3)	1 (16,7)
Respiratorni trakt (brisa grla i nosa)	2908 (32,0)	194 (6,7)	152 (78,4)	13 (8,6)	139 (91,5)
Uho	40 (0,4)	15 (37,5)	7 (46,7)	1 (14,3)	7 (90,0)
Bris genitalnog trakta	51 (0,6)	22 (43,1)	14 (63,6)	0 (0,0)	14 (100,0)
Mokraća	3284 (36,1)	900 (27,4)	824 (91,6)	37 (4,5)	787 (95,5)
Bris oka	106 (1,2)	15 (14,2)	5 (30,3)	0 (0,0)	4 (80,0)
Hemokultura	709 (7,8)	NP	30	0	30 (100,0)
Koprokultura	1070 (11,8)	NP	9	0	9 (100,0)
Ukupno	9092 (100,0)	1568 (17,2)	1254 (80,0)	126 (10,0)	1128 (90,0)

NP, podatci nisu dostupni (RR=0,7710; p<0,001)

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine ukupno je analizirano 16037 različitih uzoraka vanbolničkih pacijenata, od čega je najviše analizirano uzoraka mokraće, 9641 (60,1%), briseva respiratornog trakta, 4137 (25,8%), koprokultura, 1319 (8,2), briseva genitalnog trakta, 507 (3,2%) i briseva oka, 169 (1,0%). Broj ostalih vrsta analiziranih uzoraka se kretao od 2 do 105 (0,01%, odnosno 0,6%) ($p < 0,001$) (Tabela 7).

Od ukupno analiziranih 16037 različitih uzoraka bolničkih pacijenata, ukupno je bilo pozitivnih 3470 (21,6%) uzoraka. Prevalenca zastupljenosti pozitivnih izolata u odnosu na vrstu kliničkog materijala se kretao od najmanje 4,5% (187 od 4137) uzoraka respiratornog trakta, do najviše 81,9% (86 od 105) uzoraka kirurških rana.

Gram-negativne bakterije su izolirane iz 2857 (82,3%) od ukupno 3470 pozitivnih bolničkih uzoraka. Gram-negativne bakterije su prevladavale kao uzročnici infekcija u svim vrstama kliničkog materijala, od 11,9% do 88,7% (7 od 59, odnosno 2580 od 2910) u brisevima oka odnosno uzorcima mokraće.

Od ukupno 2857 gram-negativnih bakterija izoliranih iz različitih vrsta kliničkog materijala, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane iz 184 (6,4%) uzorka.

Najveći broj ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na ukupan broj 184, izoliran je iz uzoraka mokraće, 143 (77,7%).

Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija prema vrsti kliničkog materijala zabilježena je u uzorcima kirurških rana, 50,0% (26 ESBL od 52 gram-negativna izolata), a u ostalim uzorcima se prevalencija kretala od najmanje 1,3% (1 ESBL od 75 gram-negativnih izolata) iz briseva genitalnog trakta do 27,3% (6 ESBL od 22 gram-negativnih izolata) u infekcijama kože i mekih tkiva ($RR=0,7432$; $p < 0,001$) (Tabela 7). Relativni rizik oboljevanja je povećan 0,7432 puta kod vanbolničkih pacijenata u odnosu na bolničke pacijente (Tabela 6).

Tabela 7. Distribucija analiziranih i pozitivnih uzoraka kliničkog materijala kod vanbolničkih pacijenata

Vrsta kliničkog materijala	Broj (%) pacijenata				
	Ukupan broj pregledanih uzoraka	Ukupan broj pozitivnih uzoraka	Ukupan broj Gram-negativnih izolata	ESBL	Non-ESBL
Hirurška rana	105 (0,6)	86 (81,9)	52 (60,5)	26 (50,0)	26 (50,0)
Aspirat, punktat	0	0	0	0	0
Bris katetera	0	0	0	0	0
Bris tubusa, kanile, stome	4 (0,02)	4 (100,0)	2 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)
Koža, bris pupka	91 (0,6)	64 (70,3)	22 (34,4)	6 (27,3)	16 (72,7)
Opekotina	2 (0,01)	1 (50,0)	1 (100,0)	0	1 (100)
Respiratorni trakt (brisi grla i nosa)	4137 (25,8)	187 (4,5)	65 (34,8)	4 (6,2)	61 (93,8)
Uho	62 (0,4)	35 (56,5)	19 (54,3)	2 (10,5)	17 (89,5)
Bris genitalnog trakta	507 (3,2)	124 (24,5)	75 (60,5)	1 (1,3)	74 (98,7)
Mokraća	9641 (60,1)	2910 (30,2)	2580 (88,7)	143 (5,5)	2437 (94,5)
Bris oka	169 (1,0)	59 (34,9)	7 (11,9)	1 (14,3)	6 (85,7)
Hemokultura	0	0	0	0	0
Koprokultura	1319 (8,2)	NP	34 (100,0)	0	34 (100,0)
Ukupno	16037 (100,0)	3470 (21,6)	2857 (82,3)	184 (6,4)	2673 (93,6)

NP- podatci nisu dostupni (RR=0,7432; p<0,001)

Od 1254 gram-negativnih uzročnika bolničkih pacijenata, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane u 126 (10,0%), od čega kod 72 (57,1%) muškarca i 54 (42,9%) kod žena ($p=0,002$), a od 2857 gram-negativnih uzročnika vanbolničkih pacijenata, ESBL-producirajuće bakterije su identificirane u 184 (6,4%) slučajeva, od čega kod 76 (41,3%) muškaraca i 108 (58,7%) kod žena (Tabela 8).

Ustanovljena je statistički značajna razlika u učestalosti ESBL pozitivnih sojeva ovisno o spolu bolničkih pacijenata ($p=0,002$). Od ukupno 522 gram-negativna bolnička izolata dobijena od muškaraca, ESBL-producirajuće bakterije su izolirane iz 76 (13,8%) uzoraka, a od ukupno 732 gram-negativna bolnička izolata dobijena od žena, ESBL-producirajuće bakterije su izolirane iz 54 (7,4%) uzorka.

Od ukupno 585 gram-negativna vanbolnička izolata dobijena od muškaraca, ESBL-producirajuće bakterije su izolirane iz 76 (13,0%) uzoraka, a od ukupno 2272 gram-negativna vanbolnička izolata dobijena od žena, ESBL-producirajuće bakterije su izolirane iz 108 (4,8%) uzoraka ($p<0,001$) (Tabela 8).

Tabela 8. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata u odnosu na spol

Grupa	Soj	Broj (%) pacijenata		
		Muškarci	Žene	Ukupno
Bolnički	ESBL	72 (13,8)	54 (7,4)	126
	Non-ESBL	450 (86,2)	678 (92,6)	1128
	Ukupno Gram-negativnih	522	732	1254
Vanbolnički	ESBL	76 (13,0)	108 (4,8)	184
	Non-ESBL	509 (87,0)	2164 (95,2)	2673
	Ukupno	585	2272	2857

(p<0,002)

Utvrđena je statistički značajna razlika u incidenciji ESBL producirajućih Gram-negativnih bakterija ovisno o dobnim grupama bolničkih pacijenata. Najviša incidencija infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama kod bolničkih pacijenata u periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine je zabilježena u dobnjoj grupi ≥ 65 godina, 1,1/1000 stanovnika, zatim u dobnjoj grupi 0-14 godina, 0,5/1000 stanovnika i u dobnim grupama 15-64, 0,2/1000 stanovnika ($p < 0,02$) (Tabela 9).

Tabela 9. Zastupljenost (incidencija) ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata prema dobnim skupinama

Dobna skupina	Broj (%) pacijenata			Incidencija ESBL (na 1000)	Populacija
	ESBL	Non-ESBL	Ukupno Gram-negativnih		
0-14	32 (7,5)	394 (92,4)	426	0,5	75.917
15-64	50 (10,3)	427 (89,7)	477	0,2	274.907
≥65	44 (12,6)	307 (87,4)	351	1,1	49.302
Ukupno	126 (10,0)	1128 (90,0)	1254	0,4	400.126

(p<0,02)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u incidenciji ESBL ovisno o dobnim grupama kod vanbolničkih pacijenata. Najviša incidencija infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama kod vanbolničkih pacijenata u periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine je zabilježena u dobnoj grupi ≥ 65 godina, 1,4/1000 stanovnika, te u dobnoj grupi 0-14 godina, 1,0/1000 stanovnika ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod vanbolničkih pacijenata prema dobnim skupinama

Dobna skupina	Broj (%) pacijenata			Incidenција ESBL (na 1000)	Populacija
	ESBL	Non-ESBL	Ukupno gram-negativnih izolata		
0-14	60 (7,8)	711 (92,2)	771	1,0	75.917
15-64	69 (6,4)	1016 (93,6)	1085	0,3	274.907
≥65	55 (5,5)	946 (94,5)	1001	1,4	49.302
Ukupno	184 (6,4)	2673 (93,6)	2857	0,6	400.126

(p>0,05)

Uočena je statistički značajna razlika u incidenciji infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama kod vanbolničkih pacijenata. U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine najviša incidencija je zabilježena u općinama Zenica i Zavidovići, 1,0/1000 stanovnika, i Kakanj, 0,5/1000 stanovnika. U ostalim općinama incidencija se kretala od 0,08/1000 do 0,9/1000 stanovnika ($p < 0,001$) (Tabela 11).

Tabela 11. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod vanbolničkih pacijenata ovisno o mjestu stanovanja

Općina	Broj stanovnika	Broj (%) pacijenata			
		Vanbolnički pacijenti			
		ESBL	Non-ESBL	Ukupno gram-negativnih izolata	Incidencija ESBL (na 1000)
Zenica	127.103	101 (7,3)	1274 (92,7)	1375 (48,1)	1,0
Žepče	31.056	8 (7,9)	93 (92,1)	101 (3,5)	0,3
Maglaj	23.381	1 (4,3)	22 (95,7)	23 (0,8)	0,08
Kakanj	43.300	17 (4,0)	412 (96,0)	429 (15,0)	0,5
Zavidovići	37.983	29 (7,4)	363 (92,6)	392 (13,7)	1,0
Visoko	40.320	16 (5,0)	306 (95,0)	322 (11,3)	0,5
Breza	14.483	5 (4,8)	99 (95,2)	104 (3,7)	0,4
Vareš	10.554	7 (6,3)	104 (93,7)	111 (3,9)	0,9
Ukupno	328.180	184 (6,4)	2673 (93,6)	2857 (100,0)	0,7

(p<0,001)

Uočena je statistički značajna razlika između ESBL i non-ESBL infekcija kod bolničkih pacijenata ovisno o mjestu boravka prije prijema u bolnicu. Zastupljenost infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim gram-negativnim bakterijama kod bolničkih pacijenata koji su prije prijema u bolnicu boravili kod kuće, iznosila je 100 (79,4%) slučajeva. Kod pacijenata sa non-ESBL infekcijama od 1128, 673 (59,7%) su prije prijema u bolnicu boravili kod kuće ($p < 0,001$) (Tabela 12).

Tabela 12. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata ovisno o mjestu boravka prije prijema u bolnicu

Soj	Broj (%) pacijenata					Ukupno
	Boravak kod kuće	Boravak u drugoj bolnici	Boravak u domu	Boravak na drugom odjelu	Nedostaju podaci	
ESBL	100 (79,4)	2 (1,6)	0	14 (11,1)	10 (7,9)	126
Non-ESBL	673 (59,7)	41 (3,6)	11 (1,0)	62 (5,5)	341 (30,2)	1128
Ukupno gram-negativnih izolata	773 (61,6)	43 (3,4)	11 (0,9)	76 (6,1)	351 (28,0)	1254

(p<0,001)

Nije ustanovljena statistički značajna razlika povezanosti nastanka infekcije ESBL sa prethodnim boravkom u bolnici. Od ukupno 307 (24,5%) gram-negativnih bakterija kod bolničkih pacijenata koji su prethodno boravili u bolnici (u posljednjih 12 mjeseci prije prijema), ESBL-producirajuće bakterije su zabilježene u 41 (13,4%) slučajeva ($p>0,05$).

Od 126 pacijenata sa infekcijama ESBL-producirajućim bakterijama, 41 (32,5%) su boravili u bolnici u posljednjih 12 mjeseci ($p>0,05$).

Od 1128 pacijenta sa non-ESBL producirajućim bakterijama 266 (23,6%) su boravili u bolnici u posljednjih 12 mjeseci ($p>0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata ovisno o prethodnom boravku u bolnici (u posljednjih 12 mjeseci)

Soj	Broj (%) pacijenata			
	Prethodni boravak u bolnici			
	Da	Ne	Nedostaju podaci	Ukupno
ESBL	41 (32,5)	71 (56,3)	14 (11,2)	126
Non-ESBL	266 (23,6)	521 (46,2)	341 (30,2)	1128
Ukupno gram-negativnih izolata	307 (24,5)	592 (47,2)	355 (28,3)	1254

($p > 0,05$)

Od ukupno 41 bolnička pacijenta sa infekcijom ESBL-producirajućim bakterijama koji su prethodno boravili u bolnici (u posljednjih 12 mjeseci), najčešći odjeli prethodnog boravka su bili neurologija, pedijatrija i interno u sedam (17,1%), te kirurgija u šest (14,6%) slučajeva.

Najveća prevalencija ESBL-producirajućih bakterija među gram-negativnim izolatima je zabilježena na neurologiji, 19,4% (7 od 36), kirurškom odjelu, 18,7% (6 od 32), na internom odjelu 16,3% (7 od 43), i u jedinici intenzivne njege kirurškog odjela, 12,5% (5 od 40) što nije statistički značajno ($p>0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata koji su u posljednjih 12 mjeseci boravili u bolnici (prema bolničkim odjelima)

Odjeljenje prethodne hospitalizacije	Broj (%) pacijenata		
	ESBL	Non-ESBL	Ukupno gram-negativnih izolata
Pedijatrija	7 (7,1)	92 (92,9)	99
Dječija kirurgija	5 (11,4)	39 (88,6)	44
Ginekologija	1 (16,7)	5 (83,3)	6
Ortopedija sa traumatologija	1 (25,0)	3 (75,0)	4
Fizijatrija	1 (9,1)	10 (90,9)	11
Neurologija	7 (19,4)	29 (80,6)	36
Interno	7 (16,3)	36 (83,7)	43
Jedinica intenzivne njege	5 (12,5)	35 (87,5)	40
Kirurgija	6 (18,7)	26 (81,3)	32
Urologija	1 (50,0)	1 (50,0)	2
Nedostaju podaci	85 (9,1)	852 (90,9)	937
Ukupno	126 (10,0)	1128 (90,0)	1254

($p > 0,05$)

Nije se pokazala statistički značajna razlika u nastanku ESBL ovisno o operativnom zahvatu. Od 126 pacijenata sa infekcijama ESBL-producirajućim bakterijama, 20 (15,9%) su imali operativni zahvat prilikom predhodnog boravka u bolnici, a od 1128 pacijenata sa non-ESBL infekcijom 138 (12,2%) ($p>0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata ovisno o obavljenom operativnom zahvatu prilikom prethodnog boravka u bolnici

Soj	Broj (%) pacijenata			Ukupno
	Operativni zahvat prilikom prethodnog boravka u bolnici		Nedostaju podaci	
	Da	Ne		
ESBL	20 (15,9)	92 (73,0)	14 (11,1)	126
Non ESBL	138 (12,2)	649 (57,5)	341 (30,3)	1128
Ukupno gram-negativnih izolata	158 (12,6)	741 (59,1)	355 (28,3)	1254

($p > 0,05$)

Od ukupno 887 bolnička pacijenta sa infekcijom uzrokovanom gram-negativnim izolatima, 110 (12,4%) su imali kontakt sa osobom koja je boravila u bolnici u odnosu na kontakt kod pacijenata sa non-ESBL infekcijom, 777 (87,6%).

Od 126 pacijenata sa infekcijom ESBL-producirajućim bakterijama, 110 (87,3%) su imali kontakt sa osobom koja je boravila u bolnici a kod pacijenata koji su imali infekciju sa non-ESBL producirajućim bakterijama, 777 od 1128 infekcije (68,9%) su imali kontakt ($p>0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata ovisno o tome da li su bili u kontaktu sa osobom koja je boravila u bolnici u prethodna 4 mjeseca

Soj	Broj (%) pacijenata			Ukupno
	Kontakt sa osobom koja je boravila u bolnici			
	Da	Ne	Nedostaju podaci	
ESBL	110 (87,3)	2 (1,6)	14 (11,1)	126
Non-ESBL	777 (68,9)	7 (0,6)	344 (30,5)	1128
Ukupno gram-negativnih izolata	887 (70,7)	9 (0,7)	358 (28,6)	1254

(p>0,05)

Od 126 bolničkih pacijenata sa ESBL-infekcijom, 41 (32,5%) su imali operativni zahvat tokom boravka u bolnici, a kod pacijenata sa non-ESBL infekcijom 230 od 1128 (20,4%) pacijenta su imali operativni zahvat tokom boravka u bolnici ($p>0,05$) (Tabela 17).

Tabela 17. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih pacijenata ovisno o tome da li su imali operaciju u toku trenutne hospitalizacije

	Broj (%) pacijenata			
	Operacija u toku sadašnje hospitalizacije			
ESBL/Non-ESBL	DA	NE	Nedostaju podaci	Ukupno
ESBL	41 (32,5)	71 (56,4)	14 (11,1)	126
Non-ESBL	230 (20,4)	554 (49,1)	344 (30,5)	1128
Ukupno	271 (21,6)	625 (49,8)	358 (28,6)	1254

($p > 0,05$)

Od 126 bolničkih pacijenata koji su imali ESBL-infekciju, 113 (89,7%) pacijenata su koristili antibiotike u prethodna 4 mjeseca, a kod non-ESBL infekcija, 713 od 1128 (63,2%) pacijenta je koristilo antibiotike u prethodna 4 mjeseca ($p>0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata ovisno o upotrebi antibiotika u prethodna 4 mjeseca kod bolničkih pacijenata

Soj	Broj (%) pacijenata			Ukupno gram-negativnih izolata
	Upotreba antibiotika		Nedostaju podaci	
	DA	NE		
ESBL	113 (89,7)	3 (2,4)	10 (7,9)	126
Non-ESBL	713 (63,2)	19 (1,7)	396 (35,1)	1128
Ukupno	826 (65,9)	22 (1,7)	406 (32,4)	1254

(p>0,05)

Od 126 bolničkih pacijenata sa ESBL-infekcijom, 47 (37,3%) su koristili kortikosteroide u prethodna 4 mjeseca, a kod non-ESBL infekcija, 347 od 1128 (30,8%) pacijenata je koristilo kortikosteroide u prethodna 4 mjeseca ($p>0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata ovisno o upotrebi kortikosteroida u prethodna 4 mjeseca kod bolničkih pacijenata

Soj	Broj (%) pacijenata			
	Upotreba kortikosteroida		Nedostaju podaci	Ukupno
	Da	Ne		
ESBL	47 (37,3)	65 (51,6)	14 (11,1)	126
Non-ESBL	347 (30,8)	371 (32,9)	410 (36,3)	1128
Ukupno gram-negativnih izolata	394 (31,4)	436 (34,8)	424 (33,8)	1254

($p > 0,05$)

Najčešći uzročnici izolirani iz različitih infekcija kod bolničkih pacijenata među 1254 gram-negativna izolata su bile bakterije *Escherichia coli*, u 408 (32,5%), *Klebsiella pneumoniae*, u 323 (25,8%), *Proteus* spp., u 201 (16,0%), i *Citrobacter* spp., 107 (8,5%), slučajeva.

Od ukupno izoliranih 126 ESBL-producirajućih bakterija bolničkih pacijenata, najviše ih je izolirano kod vrsta *Klebsiella* i *Proteus*, 46 odnosno 20 (36,5 % odnosno 15,9%).

Prevalencija ESBL-producirajućih bakterija je bila najviša među bolničkim izolatima *Pseudomonas* spp., 17,7% (11 od 62), *Acinetobacter* spp., 15,6% (7 od 45), *Enterobacter* spp., 15,6% (14 od 90) i *Klebsiella* spp., 14,2% (46 od 323) ($p < 0,001$) (Tabela 20).

Najčešći uzročnici izolirani iz različitih infekcija kod vanbolničkih pacijenata među 2857 gram-negativna izolata su bile bakterije *Escherichia coli*, 1704 (59,6%), *Proteus* spp., 365 (12,8%), *Klebsiella* spp., 305 (10,7%), i *Citrobacter* spp., 287 (10,0%) slučajeva.

Prevalencija vanbolničkih ESBL-producirajućih bakterija je bila najviša među izolatima *Klebsiella* spp., 16,4% (50 od 305), *Pseudomonas* spp., 12,8% (5 od 39), i *Enterobacter* spp., 13,7% (16 od 117).

Od ukupno izoliranih 184 ESBL-producirajućih bakterija vanbolničkih pacijenata, najviše ih je bilo izolirano kod vrsta *E. coli* i *Klebsiella* spp., 62 odnosno 50 (33,7% odnosno 27,2%). ($p < 0,001$) (Tabela 20).

Tabela 20. Zastupljenost ESBL/Non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih/vanbolničkih pacijenata ovisno o vrsti uzročnika

Izolovani uzročnik	Broj (%) pacijenata					
	Bolnički			Vanbolnički		
	ESBL	Non-ESBL	Ukupno	ESBL	Non-ESBL	Ukupno
<i>Escherichia coli</i>	15 (3,7)	393 (96,3)	408	62 (3,6)	1642 (96,4)	1704
<i>Klebsiella</i> spp.	46 (14,2)	277 (85,8)	323	50 (16,4)	255 (83,6)	305
<i>Enterobacter</i> spp.	14 (15,6)	76 (84,4)	90	16 (13,7)	101 (86,3)	117
<i>Citrobacter</i> spp.	10 (9,3)	97 (90,7)	107	26 (9,1)	261 (90,9)	287
<i>Proteus</i> spp.	20 (9,9)	181 (90,1)	201	20 (5,5)	345 (94,5)	365
<i>Morganella morganii</i>	2 (18,2)	9 (81,8)	11	3 (25,0)	9 (75,0)	12
<i>Providentia rettgeri</i>	1 (14,3)	6 (85,7)	7	1 (16,7)	5 (83,3)	6
<i>Pseudomonas</i> spp.	11 (17,7)	51 (82,3)	62	5 (12,8)	34 (87,2)	39
<i>Acinetobacter</i> spp.	7 (15,6)	38 (84,4)	45	1 (4,5)	21 (95,5)	22
Ukupno	126 (10,0)	1128 (90,0)	1254	184 (6,4)	2673 (93,6)	2857

(p<0,001)

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine analizirana su 1254 gram-negativna izolata, od čega su ESBL-producirajuće bakterije zabilježene kod 126 (10,0%) bolničkih izolata (Tabela 4). Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 2857 gram-negativnih bakterija od čega ESBL-producirajuće su zabilježene kod 184 (6,4%) izolata (Tabela 5).

Osjetljivost izolata testirana disk-difuzijskom metodom kod 126 ESBL-producirajućih izolata dobivenih od bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od najmanje 5,9% na cefepim (FEP), do najviše, 98,0% na amoksicilin (AMX). Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 90,0% slučajeva na cefaleksin (CN), 46,3% na sulfometoksazol-trimetoprim (SXT), 25,7% na ciprofloksacin (CIP). Rezistencija na imipenem (IMI) je zabilježena u 5,9% slučajeva ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Od ukupno 1127 ESBL-negativnih bolničkih izolata, 59 je testirano na osjetljivost/otpornost na antibiotike. Otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od najmanje 6,7% na cefepim (FEP), do najviše, 70,1% na cefaleksin (CN). Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 71,1% na amoksicilin (AMX), 52,6% na sulfometoksazol-trimetoprim (SXT), 31,2% na ciprofloksacin (CIP). Otpornost na imipenem (IMIP) je zabilježena u 3,8% slučajeva ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Kod ukupno 184 ESBL-producirajućih bakterija dobivenih od vanbolničkih pacijenata, rezistencija na cefalosporine se kretala od najmanje 5,5% na cefepim (FEP), do najviše 95,0% na amoksicilin (AMX) i cefaleksin (CN), 59,3% izolata bilo je rezistentno na sulfometoksazol-trimetoprim (SXT), a 27,7% na ciprofloksacin (CIP). Rezistencija na imipenem (IMIP) je zabilježena u 1,2% slučajeva ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Od ukupno 2673 ESBL- negativna vanbolnička izolata osjetljivost/otpornost na antibiotike je testirana u 14 izolata. Otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od najmanje 4,0% na cefepim (FEP), do najviše 75,0% na cefaleksin (CN). 39,5% izolata bilo je rezistentno na

sulfometoksazol-trimetoprim (SXT), 67,1% na amoksicilin (AMX), i 19,7% na ciprofloksacin (CIP). Otprnost na imipenem (IMIP) je zabilježena u 7,8% slučajeva ($p < 0,05$) (Tabela 21).

Tabela 21. Antimikrobna otpornost disk-difuzijskom metodom ESBL/non-ESBL gram-negativnih izolata kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Grupa	ESBL/Non-ESBL	Prevalencija (%) otpornosti na antibiotik*																	
		AMX	AMC	CN	CXM	CTX	CRO	CAZ	FEP	CFM	IMIP	GEN	AM	TET	CIP	SXT	F/M	NOR	LVX
Bolnički	ESBL (126)	98,6	35,5	90,0	60,3	48,9	54,9	51,4	5,9	58,8	5,9	37,1	6,8	24,9	25,7	46,3	32,9	35,3	15,8
	Non-ESBL (59)	71,1	36,5	70,1	70,1	56,7	60,5	65,5	6,7	70,0	3,8	41,7	12,4	37,5	31,2	52,6	38,1	18,8	28,9
Vanbolnički	ESBL (184)	95,0	37,5	95,0	67,4	55,1	66,2	66,2	5,5	69,3	1,2	39,4	8,0	0	27,7	59,3	29,9	6,2	0
	Non-ESBL (60)	67,1	51,3	75,0	71,0	65,6	71,0	71,0	4,0	68,8	7,8	37,5	4,0	0	19,7	39,5	4,4	0	0

(p<0,05)

*amoksicilin (20µg) (AMX); amoksicilin+klavulanska kiselina (20/10 µg) (AMC); cefaleksin (30 µg) (CN); cefuroksim (30 µg) (CXM); cefotaksim (30 µg) (CTX); ceftriakson (30 µg) (CRO); ceftazidim (30 µg) (CAZ); cefepim (30 µg) (FEP); cefiksim (5 µg) (CFM); imipenem (10 µg) (IMIP); gentamicin (10 µg) (GEN); amikacin (30 µg) (AM); tetraciklin (30 µg) (TET); ciprofloxacina (5 µg) (CIP); sulfometoksazol-trimetoprim (1,25/23,75 µg) (SXT); nitrofurantoin (300 µg) (F/M); norfoksacin (10 µg) (NOR); loracarbef (30 µg) (LVX).

5.2. DRUGI DIO ISTRAŽIVANJA – PROSPEKTIVNI

5.2.1. Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata *Escherichia coli*

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine zabilježeno je 15 (od 408, 3,7%) ESBL-producirajuće *E. coli* izolata kod bolničkih pacijenata. Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 3,6% (62 od 1704) ESBL-producirajuće *E. coli*. Od toga 11/19 bolničkih odnosno vanbolničkih izolata su uključeni u epidemiološku i molekularnu obradu.

Od ukupno 11 i 19 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *E. coli*, 6 (54,5%) i 10 (52,6%) zabilježeno je kod žena prosječne dobne starosti 39 godina (raspon 01-78) odnosno 27 (raspon 01-82) (Tabela 22).

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata *E. coli* po odjelima se kretala od 9,1% (1 od 11) na kirurškom šoku, Odjelu za kožne bolesti i Odjelu za zarazne bolesti) do 18,2% (2 od 11) na odjelu za dječije bolesti, odjelu za neurologiju, odjelu za interne bolesti, te na odjelu za fizikalnu terapiju (Tabela 22).

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) određena je pripadnost porodici ESBL: SHV, TEM, CTX-M, PER, OXA, te plazmidne AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze. Tipizacija ESBL učinjena je za ukupno 11 bolničkih i 19 vanbolničkih *E. coli* izolata.

Utvrđeno je 20 različitih gena u 11 bolničkih *E. coli* izolata: 7 (63,6%) su bili *bla*_{CTX-M} geni, 5 (45,5%) *bla*_{TEM}, 5 (45,5%) *bla*_{OXA} i 3 (27,3%) *bla*_{SHV} geni. Sekvencioniranjem je ustanovljena prevalencija zastupljenosti CTX-M-15 gena, 57,1% (4 od 7 *bla*_{CTX-M} gena).

Četiri od 11 (36,4%) bolničkih *E. coli* izolata posjedovali su multiple gene (beta-laktamaze širokog spektra i ESBL). Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}

+ *bla*_{OXA} na istom plazmidu, 75% (3 od 4) i jedan izolat sa kombinacijom *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV}. AmpC i PER geni nisu nađeni (Tabela 22).

Utvrđena su 31 različita gena u 19 vanbolničkih *E. coli* izolata: 11 (57,9%) su bili *bla*_{TEM} geni, 10 (52,6%) *bla*_{CTX-M}, 8 (42,1%) *bla*_{OXA}, 4 (21,1%) *bla*_{SHV} i 3 (15,8%) *bla*_{CMY-2} geni. Sekvencioniranjem je ustanovljena prevalencija zastupljenosti CTX-M-15 gena od 36,8% (7 od 19 *bla*_{CTX-M} gena).

Devet od 19 (47,4%) vanbolničkih *E. coli* izolata, nosili su multiple gene (beta-laktamaze širokog spektra, ESBL i plazmidne AmpC beta-laktamaze). Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV} + *bla*_{OXA}, 33,3 (3 od 9). Dva izolata su producirala *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV} + *bla*_{OXA} i *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{CMY} (Tabela 19). Prevalencija ESBL-producirajuće *E. coli* je bila najviša u uzorcima urina, 81,8% (9 od 11) u bolničkoj i 84,2% (16 od 19) u vanbolničkoj sredini (Tabela 22).

Tabela 22. Epidemiološke i molekularne karakteristike *E. coli* koje produciraju beta-laktamaze širokog spektra, beta-laktamaze proširenog spektra i plazmidne AmpC beta-laktamaze kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Karakteristike <i>E. coli</i>		Bolnički pacijenti n=11 (%)	Vanbolnički pacijenti n=19 (%)
Spol	Muško	5 (45,5)	9 (47,4)
	Žensko	6 (54,5)	10 (52,6)
Prosječna dobna starost (godina)		39 (01 – 78)	27 (01 – 82)
Prosjek dana boravka u bolnici		15 (5 – 17)	-
Primjena antibiotika	Jedan antibiotik: AMC/CIP	3 (27,3)	-
	Dva antibiotika: GM-AMC/MET-CZ	3 (27,3)	
	Tri antibiotika: GM-AMC-PEM	1 (9,1)	
	Nije detektirano	4 (36,3)	
Bolnički odjel	Odjel za dječije bolesti	2 (18,2)	-
	Odjel za neurološke bolesti	2 (18,2)	
	Odjel za interne bolesti	2 (18,2)	
	Odjel za fizikalnu terapiju	2 (18,2)	
	Odjel za zarazne bolesti	1 (9,1)	
	Odjel za kožne bolesti	1 (9,1)	
	Kirurški šok	1 (9,1)	
Vrsta uzorka	Urin	9 (81,8)	16 (84,2)
	Bris kože i mekih tkiva	1 (9,1)	1 (5,3)
	Bris hirurške rane	-	2 (10,5)
	Bris kanile	1 (9,1)	-
Tipovi beta-laktamaza širokog i proširenog spektra, te pAmpC beta-laktamaze	TEM-1	5 (45,5)	11 (57,9)
	CTX-M-1	2 (18,2)	2 (10,5)
	CTX-M-3	1 (9,1)	1 (5,3)
	CTX-M-15	4 (36,4)	7 (36,8)
	SHV-1	2 (18,2)	4 (21,1)
	SHV-5	1 (9,1)	-
	OXA-1	5 (45,5)	8 (42,1)
	CMY-2	-	3 (15,8)
	Kombinacija tri i više beta-laktamaza	4 (36,4)	9 (47,4)

5.2.2. Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata *E. coli*

Od ukupno 11 izolata ESBL-producirajuće *E. coli* kod bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 45,5% na cefepim do 100,0% na cefuroksim sa rasponom MIC₉₀ 128 - \geq 256 mg/L. 100,0% izolata je iskazivalo rezistenciju na cefoksitin i gentamicin, 90,9% na piperacilin, i 63,6% na ciprofloksacin. Otpornost na imipenem je zabilježena u 9,1% slučajeva, dok je osjetljivost na meropenem i piperacilin/tazobaktam iznosila 100,0% (Tabela 23).

Od ukupno 19 izolata ESBL-producirajuće *E. coli* kod vanbolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 31,6% na cefepim do 100,0% na cefuroksim, sa rasponom MIC₉₀ 64 - \geq 256. 84,2% izolata pokazivalo je rezistenciju na cefoksitin i piperacilin, 73,7% na gentamicin, 63,2% na ciprofloksacin i 10,5% na tazobaktam. rezistencija na imipenem i meropenem nije bila zabilježena (Tabela 23).

Tabela 23. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ESBL-producirajućih izolata *E. coli* u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

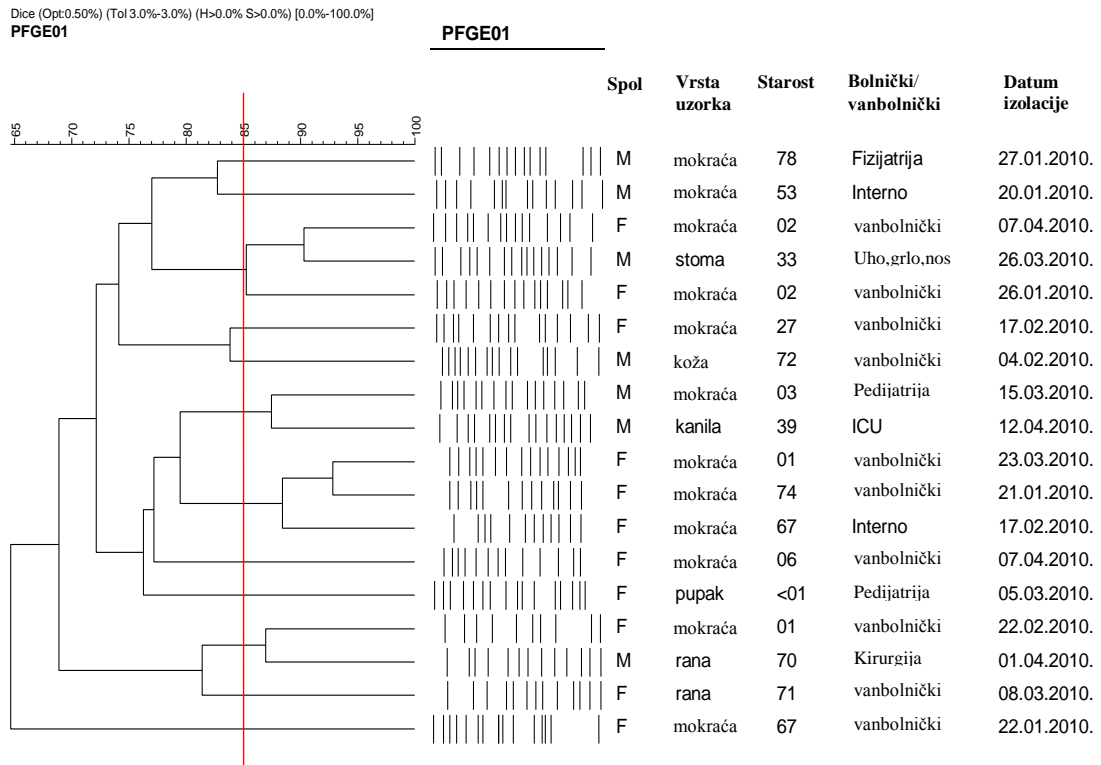
Vrsta antibiotika	MIK raspon		MIK ₅₀		MIK ₉₀		% osjetljivost		CLSI
	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički n=11 (%)	Vanbolnički n=19 (%)	
Cefuroksim	256-≥256	32-≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	100.0	100.0	32
Ceftazidim	8-≥256	1-≥256	32	16	256	≥256	81.8	52.6	32
Cefotaksim	8-≥256	1-≥256	128	64	256	≥256	81.8	63.2	64
Ceftriakson	8-≥256	≤0.12-≥256	128	128	≥256	≥256	90.9	78.9	64
Cefoksitin	64-≥256	8-≥256	≥256	256	≥256	≥256	100.0	84.2	32
Cefepim	1-256	0.25-128	16	8	128	64	45.5	31.6	32
Imipenem	≤0.06-64	≤0.06-0.5	0.12	≤0.06	2	0.25	9.1	0	16
Meropenem	≤0.06-0.25	≤0.06-2	≤0.06	≤0.06	≤0.06	1	0	0	16
Gentamicin	32-≥256	0.25-≥256	64	32	≥256	128	100.0	73.7	8
Ciprofloksacin	≤0.12-	2-512	16	8	256	256	63.6	63.2	4
Piperacilin	≥256	16-≥256	128	≥256	256	≥256	90.9	84.2	128
Piperacilin/Tazobaktam	64-≥256	2-128	16	16	32	64	0	10.5	128

*cefuroksim (30 µg); ceftazidim (30 µg); cefotaksim (30 µg); ceftriakson (30 µg); cefoksitin (30 µg); cefepim (30 µg); imipenem (10 µg);

meropenem (10 µg); gentamicin (10 µg); ciprofloksacin (5 µg); piperacilin (30 µg); tazobaktam (30 µg)

5.2.3. Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata *E. coli*

Od ukupno 30 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *E. coli*, u 18 izolata (8 bolničkih i 10 vanbolničkih) određena je genetska srodnost pomoću PFGE.



Slika 5. Dendrogram *E. coli*. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost >85% smatrali su se genetski srodnim izolatima. PFGE analiza izolata *E. coli* (18) pokazala a četiri klona (označena od A do D), sa dva do tri uzorka u svakom. Klonovi A i C sadrže jedan bolnički i dva vanbolnička izolata, klon B sadrži dva bolnička izolata i klon D sadrži jedan bolnički i jedan vanbolnički izolat (Slika 5).

5.2.4. Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp.

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine zabilježeno je 46 (od 323, 14,2%) ESBL-producirajućih *Klebsiella* spp. izolata kod bolničkih pacijenata. Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 16,4% (50 od 305) ESBL-producirajuće *Klebsiella* spp. Od toga 58/28 bolničkih odnosno vanbolničkih izolata su uključeni u epidemiološku i molekularnu obradu.

Od ukupno 51 bolnička ESBL-producirajuća izolata *Klebsiella* spp., 30 (58,8%) zabilježeno je kod žena prosječne dobne starosti 39 godina (raspon <01-82), dok je u vanbolničkoj sredini prevalencija zastupljenosti ESBL dominirala u muškoj populaciji, 57,1% (16 od 28), prosječne dobne starosti 47 godina (raspon <01-82) (Tabela 24).

Prevalencija zastupljenosti ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. po odjelima se kretala od 2,0% (1 od 51) na Odjelu za kirurški šok i Odjelu za uho grlo i nos do 41,2% (21 od 51) na Odjelu za dječije bolesti (Tabela 24).

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) određena je pripadnost rodu ESBL: SHV, TEM, CTX-M, PER, OXA, te plazmidne AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze. Tipizacija ESBL učinjena je za ukupno 51 bolničkih i 28 vanbolničkih *Klebsiella* spp. izolata.

Utvrđeno je 136 različita gena u 51 bolnička *Klebsiella* spp. izolata: 43 (84,3%) su bili *bla*_{CTX-M} geni, 37 (72,5%) *bla*_{TEM}, 31 (60,8%) *bla*_{SHV}, 21 (41,2%) *bla*_{OXA} i 4 (7,8%) *bla*_{AmpC} geni. Sekvencioniranjem je ustanovljena prevalencija zastupljenosti CTX-M-15 gena, 62,8% (27 od 43 *bla*_{CTX-M} gena).

Trideset i tri od 51 (64,7%) bolnička *Klebsiella* spp. izolata nosila su multiple gene. Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV}, 39,4% (13 od 33) i devet (27,3%) izolata sa kombinacijom *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{SHV} + *bla*_{OXA}. Dva izolata su bili

nosioci kombinacije četiri i pet gena, i to jedan: $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{AmpC}$ i kombinacija: $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{OXA} + bla_{AmpC}$ gena. bla_{PER} geni nisu nađeni (Tabela 24).

Utvrđeno je 29 različita gena u 28 vanbolničkih *Klebsiella* spp. izolata: 12 (42,9%) su bili bla_{TEM} geni, 6 (21,4%) bla_{CTX-M} , 6 (21,4%) bla_{SHV} , 4 (14,3%) bla_{OXA} i 1 (3,6%) bla_{AmpC} geni. Sekvencioniranjem je ustanovljena prevalencija zastupljenosti CTX-M-15 gena, 83,3% (5 od 6 bla_{CTX-M} gena).

Pet od 28 (17,9%) vanbolnička *Klebsiella* spp. izolata nosila su multiple gene. Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{OXA}$, 40,0% (2 od 5), a istom prevalencijom u kombinaciji: $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{OXA}$. Jedan izolat je producirao $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$ (Tabela 24).

Prevalencija zastupljenosti ESBL-producirajućih *Klebsiella* spp. izolata je bila najviša u uzorcima urina, 54,9% (28 od 51) u bolničkoj i 67,9% (19 od 28) u vanbolničkoj sredini (Tabela 24).

Tabela 24. Epidemiološke i molekularne karakteristike *Klebsiella* spp. koje produciraju beta-laktamaze širokog spektra, beta-laktamaze proširenog spektra i plazmidne AmpC beta-laktamaze kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Karakteristike <i>Klebsiella</i> spp.		Bolnički pacijenti n=51 (%)	Vanbolnički pacijenti n=28 (%)
Spol	Muško	21 (41.2)	16 (57.1)
	Žensko	30 (58.8)	12 (42.9)
Prosječna dobna starost (godine)		39 (<01 – 82)	47 (<01 – 82)
Prosjek dana boravka u bolnici		12 (2 – 154)	-
Primjena antibiotika	Jedan antibiotik: AMC/CZ/GM/CIP/IMI/VA/FEP/AZM	34 (66.7)	-
	Dva antibiotika: GM-AMC/GM-CZ/MET-CZ/GM-PEM/AMC-IMI	8 (15.7)	
	Tri antibiotika: GM-AMC-PEM	3 (5.9)	
	Nije detektirano	6 (11.8)	
Bolnički odjel	Odjel za dječije bolesti	21 (41.2)	-
	Odjel za neurološke bolesti	12 (23.5)	
	Odjel za interne bolesti	6 (11.8)	
	Odjel za zarazne bolesti	3 (5.9)	
	Odjel za ortopediju i traumatologiju	3 (5.9)	
	Odjel za fizikalnu terapiju	2 (3.9)	
	Odjel za kirurške bolesti	2 (3.9)	
	Odjel za uho, grlo i nos	1 (2.0)	
Hirurški šok	1 (2.0)		
Vrsta uzorka	Urin	28 (54.9)	19 (67.9)
	Bris pupka	9 (17.6)	1 (3.6)
	Bris gornjih dišnih puteva	5 (9.8)	1 (3.6)
	Bris hirurške rane	4 (7.8)	6 (21.4)
	Stoma	3 (5.9)	-
	Bris kože i mekih tkiva	1 (2.0)	-
	Bris kanile	1(2.0)	-
	Bris očiju	-	1 (3.6)
Tipovi beta-laktamaza širokog i proširenog spektra, te pAmpC beta-laktamaze	TEM-1	37 (72.5)	12 (42.9)
	CTX-M-1	13 (25.5)	-
	CTX-M-3	2 (3.9)	-
	CTX-M-15	27 (52.9)	5 (17.9)
	CTX-M-22	-	1 (3.6)
	CTX-M-28	1 (2.0)	-
	SHV-1	30 (58.8)	6 (21.4)
	SHV-5	1 (2.0)	-
	OXA-1	21 (41.2)	4 (14.3)
	CMY-2	2 (3.9)	1 (3.6)
	DHA-1	2 (3.9)	-
Kombinacija tri i više beta-laktamaza	33 (64.7)	5 (17.9)	

5.2.5. Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp.

Od ukupno 51 izolat ESBL-producirajuće *Klebsiella* spp. kod bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 54,9% na cefepim do 96,1% na cefuroksim sa rasponom MIC₉₀ 256 - ≥256 mg/L. Visoke stope rezistencije zabilježene su u slučajeva na cefoksitin (96,1%), na piperacilin (82,4%,) 74,5% na gentamicin i 54,9% na ciprofloksacin. Otpornost na imipenem je zabilježena u 13,7% slučajeva, dok je osjetljivost na meropenem i piperacilin/tazobaktam iznosila 100,0% i 90,2% (Tabela 25).

Od ukupno 28 izolata ESBL-producirajuće *Klebsiella* spp. kod vanbolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 42,9% na cefepim do 100,0% na cefuroksim, sa rasponom MIC₉₀ 64 - ≥256. Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 82,1% na gentamicin, 71,4% na cefoksitin, 67,9% na piperacilin, 53,6% na ciprofloksacin i 10,7% na tazobaktam. Otpornost na imipenem i meropenem nije bila zabilježena (Tabela 25).

Tabela 25. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

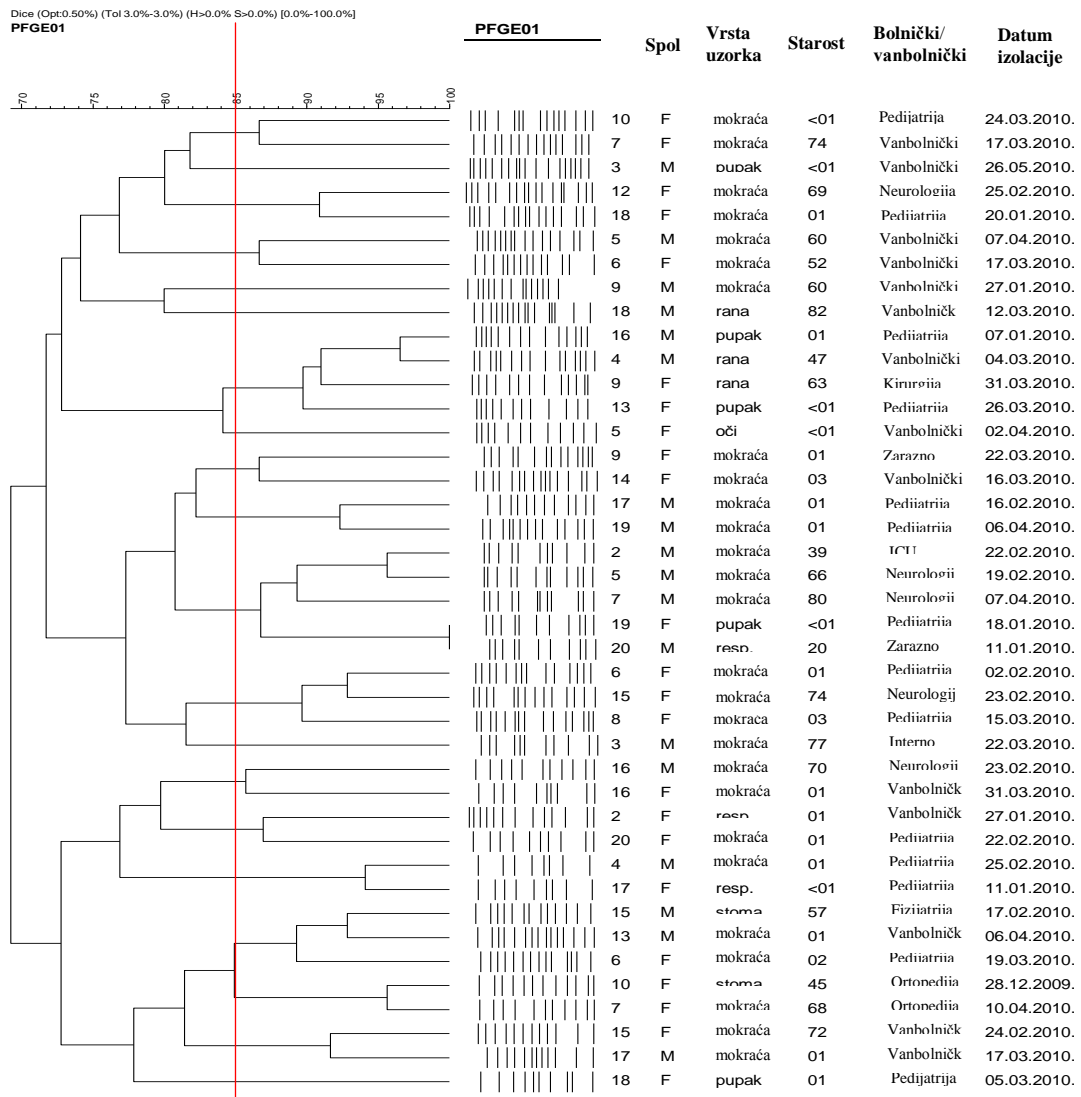
Vrsta antibiotika	MIK raspon		MIK ₅₀		MIK ₉₀		% osjetljivosti		CLSI
	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički n=51 (%)	Vanbolnički n=28 (%)	
Cefuroksim	4->256	32->256	≥256	≥256	≥256	≥256	96.1	100.0	32
Ceftazidim	≤0.12->256	≤0.12-512	64	64	≥256	≥256	78.4	85.7	32
Cefotaksim	≤0.12->256	≤0.12->256	128	64	256	256	80.3	64.3	64
Ceftriakson	≤0.12->256	≤0.12->256	256	128	≥256	≥256	86.3	64.3	64
Cefoksitin	8->256	1->256	≥256	256	≥256	≥256	96.1	71.4	32
Cefepim	≤0.12->256	≤0.12-128	32	16	256	64	54.9	42.9	32
Imipenem	≤0.06-64	≤0.06-2	0.25	≤0.06	16	0.5	13.7	0	16
Meropenem	≤0.06-1	≤0.06-4	≤0.06	≤0.06	0.12	2	0	0	16
Gentamicin	≤0.12->256	0.25->256	32	32	256	≥256	74.5	82.1	8
Ciprofloksacin	≤0.12->256	≤0.12-512	8	4	128	128	54.9	53.6	4
Piperacilin	8->256	4->256	256	≥256	≥256	≥256	82.4	67.9	128
Piperacillin/Tazobaktam	≤0.12-256	4-256	32	16	64	64	9.8	10.7	128

*cefuroksim (30 µg); ceftazidim (30 µg); cefotaksim (30 µg); ceftriakson (30 µg); cefoksitin (30 µg); cefepim (30 µg); imipenem (10 µg);

meropenem (10 µg); gentamicin (10 µg); ciprofloksacin (5 µg); piperacilin (30 µg); piperacilin/tazobaktam (30 µg)

5.2.6. Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp.

Od ukupno 79 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp., u 41 izolat (27 bolničkih i 14 vanbolničkih) određena je genetska sličnost pomoću PFGE.



Slika 6. Dendogram *Klebsiella* spp. Svi izolati kod kojih je genetska srodnostt >85% smatrali su se genetski srodnim izolatima. PFGE analiza uzoraka *Klebsiella* spp. pokazala je, da je 41 uzorak razvrstan u 14 klonova (označena od A do M), sa dva do pet uzoraka u svakom. Klonovi H i LJ sadrže po pet izolata i to jedan klon sadrži pet bolnička izolata, drugi četiri bolnička i jedan vanbolnički, klon D sadrži tri bolnička izolata i jedan vanbolnički. Ostali klonovi sadrže jedan do tri izolata iz bolničke i vanbolničke sredine (Slika 6).

5.2.7. Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata *Enterobacter cloacae*

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine zabilježeno je 14 (od 90, 15,6%) ESBL-producirajućih izolata *Enterobacter cloacae* kod bolničkih pacijenata. Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 13,7% (16 od 117) ESBL-producirajuće *E. cloacae*. Od toga 8/3 bolnička odnosno vanbolnička izolata su uključena u epidemiološku i molekularnu obradu.

Od ukupno 8 i 3 bolnička i vanbolnička ESBL-producirajuća izolata *Enterobacter cloacae*, 75,0% (6 od 8) i 66,7% (2 od 3) zabilježeno je kod muške populacije prosječne dobne starosti 44 godina (raspon <01-73) i 65 (raspon 46-85) (Tabela 26).

Prevalencija zastupljenosti ESBL-producirajućih izolata *Enterobacter cloacae* po odjelima se kretala od 12,5% (1 od 8) na odjelu za kirurške bolesti, odjelu za interne bolesti i odjelu za uho, grlo i nos do 25,0% (2 od 8) i 37,5% (3 od 8) na odjelu za dječije bolesti i kirurški šok (Tabela 26).

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) određena je pripadnost porodici ESBL: SHV, TEM, CTX-M, PER, OXA. PCR-om su detektirane i plazmidne AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze. Tipizacija ESBL učinjena je za ukupno 8 bolničkih i 3 vanbolnička *E. cloacae* izolata.

Utvrđeno je 11 različitih gena u 8 bolnička *E. cloacae* izolata: 4 (50,0%) su bili *bla*_{TEM} geni, 3 (37,5%) *bla*_{CTX-M}, 2 (25,0%) *bla*_{SHV} i po jedan (12,5%) *bla*_{OXA} i *bla*_{CMY} geni. Sekvencioniranjem je ustanovljena prevalenca zastupljenosti CTX-M-1, CTX-M-15 i CTX-M-28 gena, 12,5% (po 1 od 8 *bla*_{CTX-M} gena).

Dva od 8 (25,0%) bolnička *E. cloacae* izolata nosila su multiple gene. Izolati su bili nosioci kombinacije gena $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$ i kombinacije $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{OXA}$. PER geni nisu nađeni (Tabela 26).

Utvrđeno je 6 različitih *bla* gena u 3 vanbolnička *Enterobacter cloacae* izolata: 2 (66,7%) su bili bla_{TEM} geni, 2 (66,7%) bla_{CTX-M} i 2 (66,7%) bla_{OXA} . Dva od 3 (66,7%) vanbolnička *E. cloacae* izolata nosila su multiple gene. Izolati su bili nosioci kombinacije gena $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{OXA}$ (Tabela 26).

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae* je bila najviša u uzorcima brisa kirurških rana, 37,5% (3 od 8) u bolničkoj i 66,7% (2 od 3) u vanbolničkoj sredini (Tabela 26).

Tabela 26. Epidemiološke i molekularne karakteristike *Enterobacter cloacae* koje produciraju beta-laktamaze širokog spektra, i proširenog spektra i plazmidne AmpC beta-laktamaze kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Karakteristike <i>Enterobacter cloacae</i>		Bolnički pacijenti n=8 (%)	Vanbolnički pacijenti n=3 (%)
Spol	Muško	6 (75.0)	2 (66.7)
	Žensko	2 (25.0)	1 (33.3)
Prosječna dobna starost (godine)		44 (<01 – 73)	65 (46 – 85)
Prosjek dana boravka u bolnici		17 (5 – 40)	-
Primjena antibiotika	Jedan antibiotik: AMC/CZ/CIP	3 (37.5)	-
	Dva antibiotika: MET-CZ/AMC-CIP/ GM-PEM	3 (37.5)	
	Tri antibiotika: GM-MET-CZ	1 (12.5)	
	Nije detektirano	1 (12.5)	
Bolnički odjel	Hirurški šok	3 (37.5)	-
	Odjel za dječije bolesti	2 (25.0)	
	Odjel za hirurške bolesti	1 (12.5)	
	Odjel za interne bolesti	1 (12.5)	
	Odjel za uho, grlo, nos	1 (12.5)	
Vrsta uzorka	Urin	1 (12.5)	1 (33.3)
	Bris hirurške rane	3 (37.5)	2 (66.7)
	Bris kože i mekih tkiva	1 (12.5)	-
	Aspirat	1 (12.5)	-
	Bris pupka	1 (12.5)	-
	stoma	1 (12.5)	-
Tipovi beta-laktamaza širokog i proširenog spektra, te pAmpC beta-laktamaze	TEM-1	4 (50.0)	2 (66.7)
	CTX-M-1	1 (12.5)	1 (33.3)
	CTX-M-15	1 (12.5)	1 (33.3)
	CTX-M-28	1 (12.5)	-
	SHV-1	2 (25.0)	-
	OXA-1	1 (12.5)	2 (66.7)
	CMY-2	1 (12.5)	-
	Kombinacija tri i više beta-laktamaza	2 (25.0)	2 (66.7)

5.2.8. Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae*

Od ukupno 8 ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae* kod bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 25,0% na cefepim do 87,5% na cefuroksim sa rasponom MIC₉₀ 64 - \geq 256 mg/L. Visoki stupanj rezistencije zapažen je kod cefoksitina (87,5%) na gentamicin i piperacilin, (75%) i na ciprofloksacin (62%). Piperacilin/tazobaktam je zadržao dobru djelotvornost sa samo 12,5% rezistentnih izolata, dok je osjetljivost na imipenem i meropenem iznosila 100,0% (Tabela 27).

Od ukupno 3 ESBL-producirajuća izolata *E. cloacae* kod vanbolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 0% na cefepim do 100,0% na ceftazidim, sa rasponom MIC₉₀ 16 - \geq 256. Svi sojevi su pokazivali rezistenciju na cefoksitin i gentamicin, 33,3% na piperacilin i ciprofloksacin. Svi sojevi su bili osjetljivi na imipenem, meropenem i piperacilin/tazobaktam (Tabela 27).

Tabela 27. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ESBL-producirajućih izolata *Enterobacter cloacae* u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

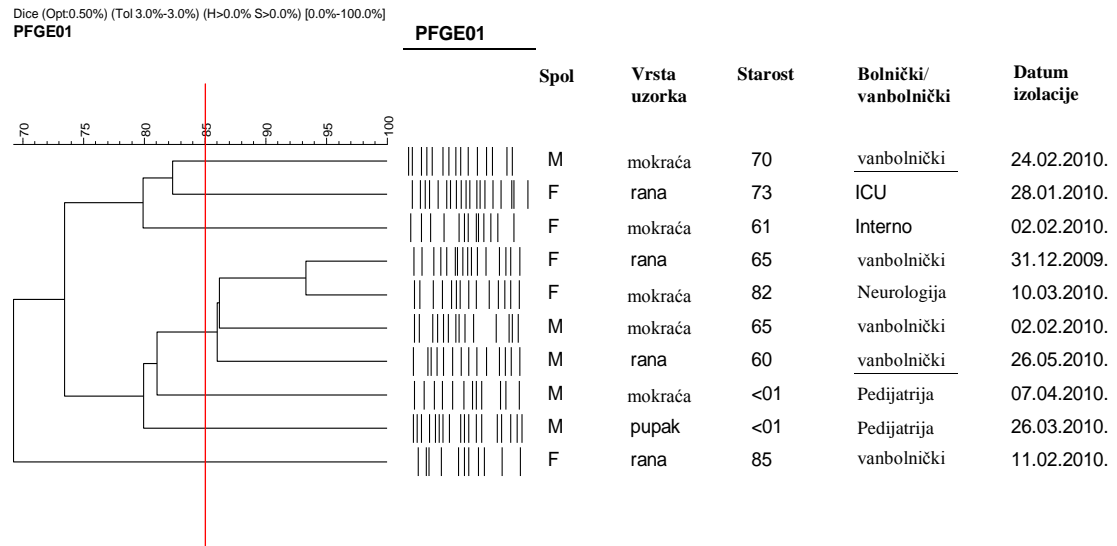
Vrsta antibiotika	MIK range		MIK ₅₀		MIK ₉₀		% osjetljivost		CLSI
	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički n=8 (%)	Vanbolnički n=3 (%)	
Cefuroksim	≤0.12-≥256	16-≥256	≥256	16	≥256	≥256	87.5	66.7	32
Ceftazidim	2-≥256	64-128	256	128	≥256	128	62.5	100.0	32
Cefotaksim	≤0.12-≥256	32-≥256	32	32	≥256	64	50.0	33.3	64
Ceftriakson	≤0.12-≥256	4-≥256	256	8	≥256	≥256	62.5	33.3	64
Cefoksitin	8-≥256	128-≥256	128	128	128	≥256	87.5	100.0	32
Cefepim	≤0.12-128	16	8	16	64	16	25.0	0	32
Imipenem	≤0.06-8	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.25	≤0.06	0	0	16
Meropenem	≤0.06-1	≤0.06	≤0.06	≤0.06	0.5	≤0.06	0	0	16
Gentamicin	≤0.12-≥256	16-≥256	32	16	≥256	≥256	75.0	100.0	8
Ciprofloksacin	≤0.12-256	1-4	4	1	128	4	62.5	33.3	4
Piperacilin	4-≥256	4-128	128	8	≥256	128	75.0	33.3	128
Piperacilin/Tazobaktam	≤0.12-≥256	2-16	32	2	64	16	12.5	0	128

*cefuroksim (30 µg); ceftazidim (30 µg); cefotaksim (30 µg); ceftriakson (30 µg); cefoksitin (30 µg); cefepim (30 µg); imipenem (10 µg);

meropenem (10 µg); gentamicin (10 µg); ciprofloksacin (5 µg); piperacilin (30 µg); tazobaktam (30 µg)

5.2.9. Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae*

Od ukupno 11 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae*, u 10 izolata (5 bolničkih i 5 vanbolničkih) određena je genetska sličnost pomoću PFGE.



Slika 7. Dendrogram *Enterobacter cloacae*. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost >85% smatrali su se genetski srodnim izolatima. PFGE analiza uzoraka *E. cloacae* pokazala je 10 uzoraka razvrstano u 1 klaster sa četiri izolata: 3 vanbolnička i jedan bolnički, te ostalih izolata svrstanih u single klon (Slika 7).

5.2.10. Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata

Proteus spp.

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine, zabilježeno je 20 (od 201, 9,9%) ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. kod bolničkih pacijenata. Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 5,5% (20 od 365) ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. Od toga 5 bolničkih i 6 vanbolničkih izolata je uključeno u epidemiološku i molekularnu obradu.

Od ukupno 5 i 6 bolnička i vanbolnička ESBL-producirajuća izolata *Proteus* spp., 80,0% (4 od 5) zabilježeno je kod populacije žena u bolničkoj sredini prosječne dobne starosti 64 godina (raspon 40-80), te 66,7% kod populacije muškaraca u vanbolničkoj sredini prosječne dobne starosti 65 godina (raspon 46-85) (Tabela 28).

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. po odjelima se kretala od 20,0% (1 od 5) na odjelu za kirurške bolesti, te do 40,0% (2 od 5) na odjelima za neurološke bolesti i za fizikalnu terapiju (Tabela 28).

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR-om) okarakterizirane su ESBL beta-laktamaze širokog spektra iz SHV, TEM, CTX-M, PER, i OXA porodice, te plazmidne AmpC beta-laktamaze i karbapenemaze. Tipizacija ESBL učinjena je za ukupno 5 bolnička i 6 vanbolnička *Proteus* spp. izolata.

Utvrđeno je 10 različitih gena u 5 bolnička *Proteus* spp. izolata: 4 (80,0%) su bili *bla*_{CTX-M} geni, 3 (60,0%) *bla*_{OXA}, 2 (40,0%) *bla*_{TEM} i jedan (20,0%) *bla*_{CMY} gen. Prevalencija *bla*_{CTX-M-1} gena bila je 60,0% (3 od 4 *bla*_{CTX-M} gena).

Jedan od 5 (20,0%) bolnička *Proteus* spp. izolata nosio je multiple gene. Izolat je bio nosilac kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{OXA} + *bla*_{CMY}. PER geni nisu nađeni (Tabela 28).

Utvrđeno je 6 različitih gena u 6 vanbolnička *Proteus* spp. izolata: 2 (33,3%) su bili *bla*_{TEM} geni, te po jedan *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} i *bla*_{OXA} (Tabela 28).

Tabela 28. Epidemiološke i molekularne karakteristike *Proteus* spp. koje produciraju beta-laktamaze širokog spektra, beta-laktamaze proširenog spektra i plazmidne AmpC beta-laktamaze kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Karakteristike <i>Proteus</i> spp.		Bolnički pacijenti n=5 (%)	Vanbolnički pacijenti n=6 (%)
Spol	Muško	1 (25.0)	4 (66.7)
	Žensko	4 (80.0)	2 (33.3)
Prosječna dobna starost (godine)		64 (40 – 80)	40 (02 – 68)
Prosjek dana boravka u bolnici		15 (7 – 17)	-
Primjena antibiotika	Jedan antibiotik: CZ/VA	3 (60.0)	-
	Dva antibiotika	-	-
	Tri antibiotika	-	-
	Nije detektirano	2 (40.0)	-
Bolnički odjel	Odjel za neurološke bolesti	2 (40.0)	-
	Odjel za fizikalnu terapiju	2 (40.0)	-
	Odjel za hirurške bolesti	1 (20.0)	-
Vrsta uzorka	Urin	1 (20.0)	2 (33.3)
	Bris hirurške rane	-	4 (66.7)
	Stoma	1 (20.0)	-
Tipovi beta-laktamaza širokog i proširenog spektra, te pAmpC beta-laktamaze	TEM-1	2 (40.0)	2 (33.3)
	CTX-M-1	3 (60.0)	1 (16.7)
	CTX-M-15	1 (20.0)	-
	SHV-1	-	1 (16.7)
	OXA-1	3 (60.0)	1 (16.7)
	CMY-2	1 (20.0)	1 (16.7)
	Kombinacija tri i više beta-laktamaza	2 (25.0)	-

5.2.11. Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp.

Od ukupno 5 ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. kod bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 40,0% na cefepim do 80,0% na cefuroksim sa rasponom MIC₉₀ od 32 - \geq 256 mg/L. Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 80,0% slučajeva na piperacilin, cefoksitin, a gentamicin i ciprofloksacin su pokazivali visoke stope rezistencije od 60% (Tabela 29). Niti jedan soj nije pokazivao rezistenciju na imipenem, meropenem i piperacilin/tazobaktam.

Od ukupno 6 ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. kod vanbolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 33,3% na cefepim do 100,0% na cefuroksim, sa rasponom MIC₉₀ 128 - \geq 256. Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 66,7% na cefoksitin i gentamicin, 50,0% na piperacilin i ciprofloksacin, a otpornost na imipenem, meropenem i piperacilin/tazobaktam nije bila zabilježena (Tabela 29).

Tabela 29. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

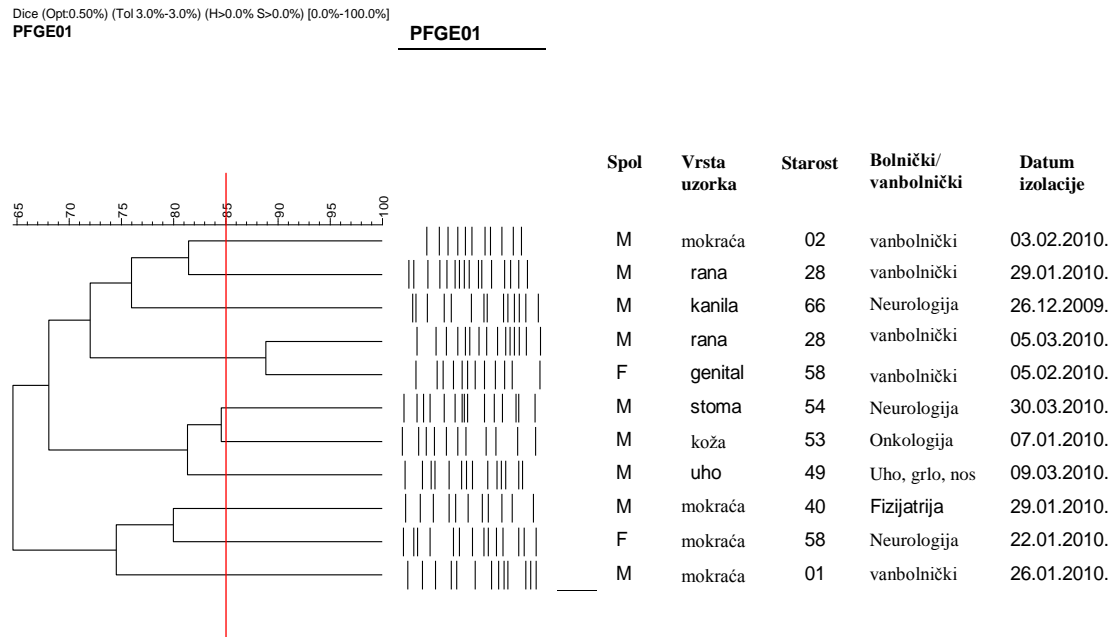
Vrsta antibiotika	MIK range		MIK ₅₀		MIK ₉₀		% osjetljivost		CLSI
	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički n=5 (%)	Vanbolnički n=6 (%)	
Cefuroksim	≤0.12-≥256	256-≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	80.0	100.0	32
Ceftazidim	≤0.12-64	≤0.12-256	32	32	32	256	60.0	66.7	32
Cefotaksim	≤0.12-128	≤0.12-≥256	64	32	128	128	80.0	50.0	64
Ceftriakson	≤0.12-≥256	≤0.12-≥256	64	64	128	256	60.0	66.7	64
Cefoksitin	≤0.12-≥256	1-≥256	256	128	≥256	≥256	60.0	66.7	32
Cefepim	≤0.12-64	≤0.12-256	16	16	32	128	40.0	33.3	32
Imipenem	≤0.06-2	≤0.06-2	2	≤0.06	2	0.25	0	0	16
Meropenem	≤0.06	≤0.06-8	≤0.06	0.25	≤0.06	8	0	0	16
Gentamicin	≤0.12-64	8-≥256	64	32	64	64	60.0	66.7	8
Ciprofloksacin	≤0.12-256	0.25-128	64	0.5	128	32	60.0	50.0	4
Piperacilin	≤0.12-≥256	8-≥256	256	64	≥256	≥256	80.0	50.0	128
Piperacilin/Tazobaktam	≤0.12-64	1-16	16	8	32	16	0	0	128

*cefuroksim (30 µg); ceftazidim (30 µg); cefotaksim (30 µg); ceftriakson (30 µg); cefoksitin (30 µg); cefepim (30 µg); imipenem (10 µg);

meropenem (10 µg); gentamicin (10 µg); ciprofloksacin (5 µg); piperacilin (30 µg); tazobaktam (30 µg)

5.2.12. Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp.

Od ukupno 11 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp., u 11 izolata (6 bolničkih i 5 vanbolničkih) određena je genetska sličnost pomoću PFGE.



Slika 8. Dendrogram *Proteus* spp. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost >85% smatrani su se genetski srodnim izolatima. PFGE analiza uzoraka *Proteus* spp. pokazala je 11 uzoraka razvrstano u dva klona (označena A i B), sa dva uzorka u svakom. Klona A sadrži dva vanbolnička izolata, a klona B dva bolnička izolata. Ostali izolati su označeni kao single clone (Slika 8).

5.2.13. Epidemiološke i molekularne karakteristike ESBL-producirajućih izolata

Acinetobacter spp.

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine zabilježeno je 7 (od 45, 15,6%) ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. kod bolničkih pacijenata. Kod vanbolničkih pacijenata izolirano je 4,5% (1 od 22) ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. Od toga 10/3 bolnička odnosno vanbolnička izolata uključena su u epidemiološku i molekularnu obradu.

Od ukupno 10 i 3 bolnička i vanbolnička ESBL-producirajuća izolata *Acinetobacter* spp., 80,0% (8 od 10) i 66,7% (2 od 3) izolirano je kod muške populacije prosječne dobne starosti 53 godina (raspon <01-78) i 46 (raspon 28-58) (Tabela 30).

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. po odjelima se kretala od 10,0% (1 od 10 na odjelima za neurološke bolesti, dječije bolesti, onkološke bolesti, uho, grlo i nos, ortopediju i traumatologiju i na odjelu za kožne bolesti do 20,0% (2 od 10) na Odjelu za kirurški šok i Odjelu za kirurške bolesti) (Tabela 30).

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) određena je pripadnost rodu ESBL: SHV, TEM, CTX-M, PER, OXA beta-laktamaze i karbapenemaze. Tipizacija ESBL učinjena je za ukupno 10 bolničkih i 3 vanbolnička *Acinetobacter* spp. izolata.

Utvrđeno je 24 različita gena u 10 bolničkih *Acinetobacter* spp. izolata: 8 (80,0%) su bili *bla*_{TEM} geni, 6 (60,0%) *bla*_{OXA-51} i po 2 (20,0%) *bla*_{CTX-M} i *bla*_{OXA-1} geni.

Četiri od 10 (40,0%) bolnička *Acinetobacter* spp. izolata nosila su multiple gene. Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{OXA-1}, 50% (2 od 4) i kombinacije *bla*_{TEM} + *bla*_{OXA-51}, 50,0% (2 od 4). AmpC i PER geni nisu nađeni (Tabela 30).

Utvrđeno je 7 različitih gena u 3 vanbolnička *Acinetobacter* spp. izolata: 3 (100,0%) su bili *bla*_{TEM} geni i po 1 (33,7%) *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-51} geni.

Dva od 3 (66,7%) vanbolnička *Acinetobacter* spp. izolata, nosila su multiple gene. Jedan izolat je bio nosilac kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{OXA-51}, a drugi nosilac kombinacije gena *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *bla*_{OXA-1} (Tabela 30).

Prevalencija ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. je bila najviša u uzorcima briseva kože i mekih tkiva, 30,0% (3 od 10) u bolničkoj i 66,7% (2 od 3) iz uzoraka briseva kirurških rana u vanbolničkoj sredini (Tabela 30).

Tabela 30. Epidemiološke i molekularne karakteristike *Acinetobacter* spp. koje produciraju beta-laktamaze širokog spektra, beta-laktamaze proširenog spektra beta-laktamaze kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata

Karakteristike <i>Acinetobacter</i> spp.		Bolnički pacijenti n=10 (%)	Vanbolnički pacijenti n=3 (%)
Spol	Muško	8 (80.0)	2 (66.7)
	Žensko	2 (20.0)	1 (33.3)
Prosječna dobna starost (godine)		53 (<01 – 78)	46 (28 – 58)
Prosjek dana boravka u bolnici		15 (8 – 23)	-
Primjena antibiotika	Jedan antibiotik: AMC/IMI/FEP	6 (60.0)	-
	Dva antibiotika: MET-CZ	2 (20.0)	
	Tri antibiotika	-	
	Nije detektirano	2 (20.0)	
Bolnički odjel	Odjel za kirurški šok	2 (20.0)	-
	Odjel za hirurške bolesti	2 (20.0)	
	Odjel za neurološke bolesti	1 (10.0)	
	Odjel za dječije bolesti	1 (10.0)	
	Odjel za onkološke bolesti	1 (10.0)	
	Odjel za uho, grlo, nos	1 (10.0)	
	Odjel za ortopediju i traum.	1 (10.0)	
	Odjel za kožne bolesti	1 (10.0)	
Vrsta uzorka	Bris hirurške rane	2 (20.0)	2 (66.7)
	Bris kože i mekih tkiva	3 (30.0)	-
	Bris kanile	2 (20.0)	-
	Stoma	1 (10.0)	-
	Bris opekotine	1 (10.0)	-
	Bris užiju	1 (10.0)	-
	Bris genitalne regije	-	1 (33.3)
	Tipovi beta-laktamaza širokog i proširenog spektra, te pAmpC beta-laktamaze	TEM-1	8 (80.0)
CTX-M-1		2 (20.0)	1 (33.7)
OXA-1		2 (20.0)	1 (33.7)
OXA-51		6 (60.0)	1 (33.7)
Kombinacija tri i više beta-laktamaza		4 (40.0)	2 (66.7)

5.2.14. Antimikrobna osjetljivost ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp.

Od ukupno 10 ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. kod bolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 80,0% na cefotaksim do 100,0% na cefuroksim sa rasponom $\text{MIK}_{90} 64 - \geq 256$ mg/L. Visoke stope rezistencije zabilježene su na imipenem (90,0%), gentamicin (80,0%) piperacilin (70,0%), i na ciprofloksacin (60,0%). Osjetljivost na meropenem i piperacilin/tazobaktam iznosila je 70,0% do 80,0% (Tabela 31).

Od ukupno 3 ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. kod vanbolničkih pacijenata, otpornost na cefalosporinske antibiotike se kretala od 33,3% na cefepim do 100,0% na ceftazidim, sa rasponom $\text{MIK}_{90} 64 - \geq 256$. Otpornost na ostale antibiotike zabilježena je u 100,0% na cefoksitin, gentamicin i imipenem, 33,3% na piperacilin/tazobaktam, ciprofloksacin i meropenem a osjetljivost na piperacilin zabilježena je u 100,0% slučajeva (Tabela 31).

Tabela 31. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. u bolničkoj i vanbolničkoj sredini

Vrsta antibiotika	MIK range		MIK ₅₀		MIK ₉₀		% osjetljivosti		CLSI
	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički pacijenti	Vanbolnički pacijenti	Bolnički n=10 (%)	Vanbolnički n=3 (%)	
Cefuroksim	32-≥256	16-≥256	≥256	≥256	≥256	≥256	100.0	66.7	32
Ceftazidim	1-≥256	128-≥256	≥256	128	≥256	≥256	90.0	100.0	32
Cefotaksim	1-≥256	32-128	256	128	≥256	128	80.0	66.7	64
Ceftriakson	4-≥256	8-256	≥256	128	≥256	256	90.0	66.7	64
Cefoksitin	128-≥256	128-≥256	128	≥256	256	≥256	100.0	100.0	32
Cefepim	2-64	16-64	64	16	64	64	90.0	33.3	32
Imipenem	0.25-≥128	128-≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	90.0	100.0	16
Meropenem	0.12-≥128	≤0.06-≥128	0.12	4	128	≥128	30.0	33.3	16
Gentamicin	≤0.12-≥256	16-32	64	32	≥256	32	80.0	100.0	8
Ciprofloksacin	≤0.12-≥256	1-4	8	2	256	4	60.0	33.3	4
Piperacilin	2-≥256	4-32	128	4	≥256	32	70.0	0	128
Piperacilin/Tazobaktam	2-128	2-128	16	4	128	128	20.0	33.3	128

*cefuroksim (30 µg); ceftazidim (30 µg); cefotaksim (30 µg); ceftriakson (30 µg); cefoksitin (30 µg); cefepim (30 µg); imipenem (10 µg);

meropenem (10 µg); gentamicin (10 µg); ciprofloksacin (5 µg); piperacilin (30 µg); tazobaktam (30 µg)

5.2.15. Klonalna pripadnost ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp.

Od ukupno 13 bolničkih i vanbolničkih ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp., u 4 izolata (3 bolnička i 1 vanbolnički) određena je genetska sličnost pomoću PFGE.



Slika 9. Dendrogram *Acinetobacter* spp. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost >85% smatrali su se genetski srodnim izolatima. PFGE analiza uzoraka *Acinetobacter* spp. pokazala je 4 uzorka razvrstana u jedan klon sa dva bolnička uzorka. Ostali izolati su označeni kao single clone (Slika 9).

6. RASPRAVA

6.1. PRVI DIO RASPRAVE-retrospektivni

U periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine ukupno je analizirano 9092 različita uzorka dobijena od bolničkih pacijenata, te je analizirano 16037 različitih uzoraka dobijenih od vanbolničkih pacijenata. Metodama disk-difuzijskog sinergističkog testa identificirano je 126 ESBL-producirajućih izolata.

Sojevi koji luče beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) su se prvi puta pojavili u Njemačkoj osamdesetih godina prošlog stoljeća a danas su rasprostranjeni širom svijeta i predstavljaju veliki terapijski problem u bolnicama i vanbolničkoj sredini. ESBL su otkrivene u gram-negativnih štapićastih bakterija sa različitom prevalencijom, međutim, najveći broj ovih enzima otkriven je u porodici *Enterobacteriaceae* (44). Prevalencija infekcija uzrokovanih sa ESBL-producirajućim bakterijama je najveća kod izolata *K. pneumoniae* u bolničkoj sredini s oko 40% pozitivnih izolata (132, 135, 136, 214, 215). Druga po učestalosti lučenja ESBL je *Escherichia coli* s oko 4% pozitivnih sojeva koja je najčešće izolirana bakterija u mikrobiološkom laboratoriju (20).

6.1.1. Prevalencija ESBL-producirajućih izolata

U ovome istraživanju je, prema dostupnim podacima dobivenim u Kantonalnoj bolnici Zenica, u razdoblju od pet mjeseci, istraživana prevalencija i antimikrobna rezistencija Gram-negativnih bakterija koje luče beta-laktamaze proširenog spektra na području Zeničko-Dobojskog kantona kod bolničkih i vanbolničkih pacijenata.

U Kantonalnoj bolnici Zenica 2007. je ustanovljena prevalencija ESBL izolata od 2,0% među svim gram-negativnim izolatima, a najveći broj je izoliran na dječijem odjelu (5,4%) (216).

Učestalost ESBL-producirajućih bakterija u ovom istraživanju je iznosila 10,0% kod bolničkih i 6,4% kod vanbolničkih pacijenata ($p < 0,001$). Time je potvrđena hipoteza da je učestalost infekcija uzrokovanih sojevima koji proizvode beta - laktamaze proširenog spektra (ESBL) viša u bolničkoj nego u vanbolničkoj sredini. Dosadašnja istraživanja na području Zeničko-dobojskog kantona koja se odnose mahom na vanbolničke infekcije su pokazala da je u vanbolničkoj sredini ustanovljena visoka prevalencija otpornosti na antibiotike kod izolata iz mokraćnog sistema (122), viša prevalencija ESBL-producirajućih izolata kod *K. pneumoniae* nego kod *E. coli* (7,8% odnosno 0,7%), te kod djece mlađe od 6 godina iznosila (1,6% odnosno 3,8 %) (122), kao i dominacija SHV beta-laktamaza među izolatima *K. pneumoniae* i *E. coli* (7.8%/0.7%) (118) što je inače neuobičajeno za vanbolničku sredinu (165).

Kako učestalost ESBL-producirajućih bakterija varira ovisno o geografskom području pa i unutar jedne države, prevalencija ESBL ustanovljena u ovom istraživanju (10,0%) je relativno niska u usporedbi s učestalošću ESBL u Portugalu (34%), Italiji (37%), SAD (44%), u zemljama Latinske Amerike (30-60%) i Turskoj (58%), ali je viša od učestalosti zabilježene u Švedskoj, Japanu i Singapuru (3%, 4% i 8%) (100). U Hrvatskoj je udio ESBL-producirajućih izolata u bolničkih pacijenata kod *E. coli* u 2008. godini iznosio 3%, a kod *K. pneumoniae* 29% kako navodi Andrašević i sur. (217).

ESBL su otkrivene u gram-negativnih štapićastih bakterija sa različitom prevalencijom, međutim, najveći broj ovih enzima otkriven je u porodici *Enterobacteriaceae* (44). Prevalencija ESBL-infekcija je najveća kod izolata *K. pneumoniae* u bolničkoj sredini, npr. u Jordanu prevalencija *K. pneumoniae* dostiže i do 80% (132), u Izraelu se kreće u rasponu od 32% do 70% (183), u Indiji 57% (134), u Turskoj 50% (132), u Egiptu 38% (135), u Libanonu 20% (136). Također, zabilježen je i porast incidencije ESBL kod bolničkih izolata *Salmonella* spp. u mnogim državama Južne

Amerike, Afrike, Europe i Azije (44). ESBL su najčešće u enterobakterija ali su opisane i u *P. aeruginosa* i *A. baumannii* (44). Ove dvije vrste mikroorganizama najčešće posjeduju ESBL iz PER ili OXA porodice ali mogu iako rijede producirati i TEM, SHV i CTX-M ESBL koje su otkrivene u nekim državama svijeta (44). PER beta-laktamaze su također bile otkrivene kod *Acinetobacter* spp. i *Alcaligenes faecalis* (44). Konačno, TEM -17 je otkrivena kod *Capnocytophaga ochrichea* i SHV-12 kod *Burkholderia cepacia* (44). Beta-laktamaze kod ovih potonjih mikroorganizama opisane su prvi put 1977. godine sa učestalošću oko 80% (137). *M. catarrhalis* producira tri tipa beta-laktamaza: BRO-1, BRO-2 i BRO-3, koje su po supstratnom profilu penicilinaze (137). ESBL organizmi su obično otkriveni u bolnicama, međutim, brojni izvještaji iz SAD-a i Francuske su dokumentovali mogućnost njihovog nastanka i u uvjetima kućne njege (44).

Učestalost ESBL-producirajućih bakterija kod bolničkih pacijenata u ovom istraživanju statistički se značajno razlikovala po bolničkim odjelima. Najveća učestalost je zabilježena na odjelu kirurgije i dječije kirurgije (27,6%), zatim na odjelu onkologije (20,0%) i neurologije (11,0%) što uključuje i jedinicu intenzivne njege (JINJ), pa je većina sojeva potjecala iz jedinica intenzivne njege ($p < 0,001$), što je u skladu sa podacima koje navodi Gniadkowski u svome istraživanju provedenom u Poljskoj 2001 godine (44). Učestalost ESBL-producirajućih bakterija bila je najniža na odjelu za zarazne bolesti (2,2%), fizijatrijskom (5,5%) i ginekološkom odjelu (5,9%), što je u skladu s podacima drugih autora (49, 177).

U posljednjih nekoliko godina došlo je do širenja infekcija uzrokovanih ESBL sojevima i u vanbolničkoj sredini (121-123). ESBL izolati iz vanbolničke sredine su prvi put zabilježeni 1998. godine u Irskoj, kod *E. coli* otporne na nalidiksičnu kiselinu, a koja je bila izolirana iz mokraće starijih pacijenata; tip enzima nije bio određen; pacijent nije bio ranije hospitaliziran, ali je primao

višestruke kurseve antibiotika (124). U našem istraživanju statistički značajno najviša incidencija infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama kod vanbolničkih pacijenata u periodu 01. 12. 2009 do 31. 04. 2010. godine je zabilježena u općinama Zenica i Zavidovići, 1,0/1000 stanovnika, i Kakanj, 0,5/1000 stanovnika ($p < 0,001$). U ostalim općinama incidencija se kretala od 0,08/1000 stanovnika do 0,9/1000 stanovnika. Najviša prevalencija je zabilježena u općini Žepče (7,9%), dok je u ostalim općinama se kretala od 4,0% u Kakanju do 7,3% u Zenici ($p < 0,001$). Također, u našem istraživanju statistički je značajno najveća učestalost ESBL-producirajućih bakterija zabilježena kod vanbolničkih pacijenata (7,9%) u općini Žepče sa incidencijom od 0,3% na 1000 stanovnika (31.056 stanovnika), a u ostalim općinama se prevalencija kretala od najmanje 4,0% u općini Kakanj (0,5 na 1000 stanovnika, 43.330) do 7,3% u općini Zenica (1,0 na 1000 stanovnika, 127.103) ($p < 0,001$). Razlika u incidenciji i prevalenciji ESBL-producirajućih bakterija ovisi o više različitih faktora, ali najčešće je povezana sa nekontrolisanom, nepravilnom i neracionalnom upotrebom antibiotika (23). Zloupotreba antibiotika, osobito beta-laktamskih antibiotika širokog spektra djelovanja, olakšava nastajanje otpornosti i pojavu infekcija bakterijama koje produciraju ESBL, kao i prijenos ESBL sojeva iz bolničke sredine u vanbolničku (125, 126). U studiji u Indiji Tada i sur. su izvijestili prevalenciju ESBL kod vanbolničkih pacijenata od 16,7% (218).

6.1.2. Prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u različitim vrstama kliničkog materijala

U našem istraživanju ESBL-producirajuće bakterije su kod bolničkih pacijenata, najčešće bile izolirane iz uzoraka mokraće (29,7%), sa statistički značajnom razlikom u odnosu na drugi klinički materijal. Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na non-ESBL prema vrsti kliničkog materijala je zabilježena u uzorcima briseva opekotina (83,3%),

a u ostalim uzorcima se prevalencija kretala od najmanje u uzorcima mokraće (4,5%) do (50%) u uzorcima aspirata i punktata ($p < 0,001$). To je u skladu s rezultatima drugih autora prema kojima su aspirati donjih dišnih puteva i uzorci mokraće među tri najčešća uzorka iz kojih se izoliraju sojevi koji luče ESBL (155, 162).

Slično kod vanbolničkih pacijenata, ESBL-producirajuće bakterije su također najčešće bile izolirane iz uzoraka mokraće (77%). Najveća specifična prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na non-ESBL prema vrsti kliničkog materijala je zabilježena u uzorcima kirurških rana (50%), a u ostalim uzorcima se prevalencija kretala od najmanje (1,3%) iz briseva genitalnog trakta do 27,3% u infekcijama kože i mekih tkiva sa statističkom značajnošću ($p < 0,001$).

Infekcije mokraćnog sistema su najučestalije od svih infekcija u bolničkih pacijenata (oko 40%). Ove infekcije su često posljedica primjene mokraćnih katetera, tako da u Americi udio mokraćnih infekcija iznosi 11,1%, u Francuskoj samo 4%, dok u Finskim bolnicama čak 34% (162). U istraživanju provedenom u Turskoj 2005. godine 21% izolata *E. coli* koja je producirala ESBL, izolirano je iz uzoraka mokraće, dok je u Španiji 2006. godine kod 6,2% infekcija mokraćnog trakta uzrokovanih ESBL-producirajućom *E. coli* zabilježena bakterijemija (219). Rudresh i sur. u istraživanju provedenom u Indiji među 103 izolata enterobakterija, ESBL su najučestalije izolirane iz uzoraka eksudata 70%, zatim uzoraka krvi 66,7% i uzoraka mokraće 59,1% (220).

U uzorcima koji su bili zastupljeni sa manjom učestalošću, kao što su bris opekotina te aspirat/punktat kod bolničkih pacijenata, te bris opekotine, bris tubusa, kanile i stome kod vanbolničkih pacijenata, učestalost izolacije ESBL-producirajućih bakterija je bila viša u odnosu na uzorke koji su češće analizirani. Ipak, broj ovih uzoraka je bio relativno mali u odnosu na

ukupan broj ispitivanih uzoraka, te nije značajnije utjecao na sveukupnu prevalenciju. To se može objasniti time što su ovi uzorci najčešće potječu od bolesnika iz jedinica intenzivne njege ili iz mjesta produžene kućne njege kod kojih je inače učestalost ESBL-producirajućih bakterija veća nego kod uzoraka sa drugih odjela (44, 54, 114).

6.1.3. Dobna prevalencija i incidencija

U našem istraživanju, ovisno o dobi pacijenta, najveća prevalencija ESBL producirajućih bakterija kod bolničkih pacijenata zabilježena je u pacijenata starijih od 65 godina (12,6%) ($p < 0,05$). Ovo je sukladno podacima autora iz Hrvatske, Španije, Tajvana i Kanade koji navode životnu dob ≥ 65 godina kod bolničkih pacijenata kao faktor rizika za nastanak infekcije ESBL-producirajućim bakterijama (105, 140, 141, 146). U istraživanju provedenom 2003.-2004. godine kod vanbolničkih pacijenata u Zeničko-Dobojskom kantonu, Uzunović-Kamberović i sur. naveli su da je veliki broj ESBL producenata zabilježen kod najstarije i najmlađe dobne skupine (> 65 godina; 4,8% i 0-6 godina; 2,6%) (122). Međutim, podaci dobiveni u našem istraživanju kod vanbolničkih pacijenata, pokazuju veću prevalenciju ESBL-producirajućih izolata u dobi od 0-14 godina (7,8%), a statistička značajnost nije utvrđena ($p > 0,05$). Ovo se može pojasniti činjenicom da se vanbolnički, odnosno ambulantno, češće liječe pacijenti mlađe životne dobi, dok su u bolničkoj sredini pacijenti starije dobi zastupljeni u relativno većem broju.

Najviša prevalencija ESBL u odnosu na dob pacijenata utvrđena je u dobnoj skupini ≥ 65 godina, a ESBL su najčešće izolirane kod infekcija koje su karakteristične za tu starosnu dob (infekcije mokraćnog trakta, kirurške rane, infekcije respiratornog trakta, infekcije kože i mekih tkiva). Obzirom da se radi o starijim pacijentima, svaki organski sistem usljed oslabljene funkcije je pogodno tlo za razvoj infekcije ESBL-producirajućim izolatima. Najviša incidencija infekcija

uzrokovanih ESBL-producirajućim Gram-negativnim bakterijama zabilježena je u dobnoj grupi ≥ 65 godina, kod bolničkih 1,1/1000 stanovnika odnosno kod vanbolničkih 1,4/1000 stanovnika. Sa našim podatkom o incidenciji podudaraju se i podaci dobiveni u istraživanju provedenom u Kanadi, gdje je najveća incidencija ESBL-pozitivnih izolata opažena u dobnoj skupini starijih od 65 godina, dok je kod mlađih od 10 godina bila iznimno niska (Pitout i sur.) (105).

Zabrinjavajući je podatak, da je velik udio ESBL-producirajućih bakterija izoliran kod novorođenčadi, a sve je više rezultata istraživanja koji govore o epidemijama na neonatalnim odjelima, uzrokovanih ESBL-producirajućim enterobakterijama, koje su nastale širenjem jednog ili više klonova, ili plazmidnim prijenosom *bla* gena između iste ili različitih bakterijskih vrsta (138). U istraživanju provedenom u Kanadi, 71% ESBL-producirajućih sojeva je izolirano iz izvanbolničkih uzoraka, češće su bili izolirani kod žena u svim dobnim skupinama, a najveća prevalencija ESBL-pozitivnih izolata opažena je u dobnoj skupini pacijenata starijih od 65 godina, dok je kod mlađih od 10 godina bila iznimno niska (147). U Hrvatskoj je tokom 2005. godine udio ESBL-producirajuće *E. coli* iznosio 2%, a veliki broj izoliran je u djece dojenačke dobi, sugerirajući porodilišta kao moguće mjesto za stjecanje otpornih sojeva kako navodi Tambić-Andrašević (145).

6.1.4. Spolna prevalencija

U našem istraživanju učestalost ESBL-producirajućih bakterija bolničkih pacijenata ovisno o spolu zabilježena je u 57% kod muškaraca (odnosno 43% kod žena) ($p=0,002$), dok je kod vanbolničkih pacijenata taj odnos bio obrnut, (58% žena odnosno 41% muškaraca) ($p<0,001$). Ovo je u skladu sa podacima dobivenih u istraživanju provedenom u Brazilu i Kanadi gdje je zabilježeno da su ESBL-producirajuće bakterije kod bolničkih pacijenata učestalije kod

muškaraca, a kod vanbolničkih pacijenata ESBL-producirajuće bakterije su učestalije kod žena (139, 221). U istraživanju provedenom 2003.-2004. godine kod vanbolničkih pacijenata u Zeničko-Dobojskom kantonu, Uzunović-Kamberović i sur. izvjestili su da je ukupna učestalost ESBL producenata bila 2%, i znatno je bila viša u muških (8%) nego u ženskih pacijenata (1%) (122). U istraživanju provedenom 2005. godine na području Zeničko-Dobojskog kantona, među djecom starosne dobi od 0-6 godina, prevalencija ESBL producirajućih bakterija iznosila je 42%. Kod dječaka je bila dva puta veća nego kod djevojčica, 69% odnosno 31% (118).

Mnogi autori navode da je prevalencija ESBL općenito viša kod muškaraca u starijoj životnoj dobi, nego kod žena (128). Okesola u istraživanju provedenom u Nigeriji navodi da je *Klebsiella* spp. kod bolničkih pacijenata učestalija kod žena (68%) nego kod muškaraca (31%) (221). Međutim, istraživanje koje je proveo Wu i sur. u bolnici u Tajvanu, od 91 izolata ESBL-producirajućih *E. coli* dobijenih iz hemokulture, 56% je izolirano kod muškaraca (148). U istraživanju koje je proveo Akram i sur. u jednoj bolnici u Indiji, *E. coli* je bila dva puta učestalija u odnosu na *Klebsiella* spp. i učestalije je izolirana kod žena (66%) (222). Marijan i sur. u istraživanju provedenom u Hrvatskoj, navode da kod vanbolničkih pacijenata većina ESBL-producirajućih izolata izolirana je kod muškaraca starijih od 40 godina, što se pak može tumačiti činjenicom da se u toj dobi kod muškaraca, zbog komplicirajućih čimbenika, infekcije mokraćnog trakta javljaju češće (147). Knežević i sur. navode da je udio ESBL-producirajućih sojeva *E. coli* gotovo dva puta bila veća kod starijih žena (4%) nego kod starijih muškaraca (2%), dok je zastupljenost ESBL-producirajućih sojeva *K. pneumoniae* kod starijih muškaraca 3,3 puta bila veća (41%) nego kod starijih žena (12%) i da je prevalencija multiplo rezistentnih sojeva *E. coli* bila statistički značajno viša kod starijih muškaraca ($p < 0,01$) dok je kod žena utvrđeno značajno

više multi rezistentnih sojeva nefermentativnih gram-negativnih štapića u mlađoj dobnoj skupini ($p < 0,05$) (223).

6.1.5. Čimbenici rizika za širenje ESBL-producirajućih izolata

Pacijenti kod kojih je zabilježena infekcija sa ESBL-producirajućim bakterijama u ovome istraživanju su prije prijema u bolnicu boravile kod kuće u 79,4% slučajeva, a 32,5% pacijenata kod kojih je zabilježena infekcija ESBL-producirajućim bakterijama su u posljednjih 12 mjeseci boravili u bolnici ($p < 0,001$). Razlog ovakvog odnosa, tj. niža prevalencija ESBL-producirajućih bakterija među pacijentima koji su imali kontakt sa bolničkom sredinom nego onih koji su boravili kod kuće, je najvjerojatnije u tome što je u ispitivanom periodu istraživanja bio zabilježen daleko veći broj onih pacijenata koji su se prvi put javili u bolnicu u odnosu na one koji su predhodno boravili u bolnici ($p < 0,001$).

Ako se uzme u obzir činjenica da pacijenti koji imaju neku kroničnu bolest češće borave u bolnici, može se reći da je faktor rizika za stjecanje ESBL infekcija predhodna hospitalizacija i da je izvor infekcije kod ovih pacijenata upravo bolnička sredina, kao što navodi Johann i sur. u istraživanju provedenom u Francuskoj (124). Babini i sur. su u periodu 1997.-1998. proveli istraživanje na 35 odjela intenzivne njege širom Sjeverne i Južne Evrope i zaključili da je bolnička sredina ključan čimbenik u širenju ESBL infekcija (114).

U više od 75% ovih studija istraživane su infekcije uzrokovane sa ESBL-producirajućim izolatima *Klebsiella* spp. Mnogi geni koji kodiraju ESBL nalaze se na velikim plazmidima (21). I prije otkrića ESBL, veliki plazmidi koji su prenosioci višestruke otpornosti bili su učestaliji u izolata *K. pneumoniae* u odnosu na *E. coli* (21). To je moguće objasniti boljim adaptacijskim mogućnostima izolata *K. pneumoniae* na bolničku okolinu. *Klebsiella* preživljavaju duže od ostalih enteričkih

bakterija na rukama osoblja i različitim površinama, što pogoduje prijenosu infekcija unutar bolnice (224). Bolničke infekcije predstavljaju najveći problem kod primjene programa kontrole infekcija. Ove infekcije mogu se pojaviti kao epidemije ili mogu biti endemske (224). Važno je razlikovati monoklonalno ili poliklonalno porijeklo infekcija uzrokovanih istim ili različitim bakterijskim klonovima (101). Ovo ima važnu ulogu u kreiranju programa kontrole infekcija. Ako su infekcije monoklonalne, to upućuje na horizontalni prijenos od pacijenta na pacijenta. Poliklonalne infekcije govore u prilog selekcijskom pritisku primjene antimikrobnih lijekova kao uzroku selekcije otpornih izolata i povećanju prevalencije infekcija ovim izolatima, iako mogu biti uzrokovane i prijenosom plazmida između različitih izolata (101, 102).

U našem istraživanju, ESBL-producirajuće bakterije zabilježene su u najvećem procentu kod bolničkih pacijenata koji su predhodno boravili (na odjelima) u jedinicama intenzivne njege, na odjelima neurologije (19,4%), kirurgije (18,7%) i internog (16,3%) o čemu je pisao Gniadkowski (Poljska, 2001) (44).

U brojnim studijama naglašena je selekcijska uloga antibiotika, naročito cefalosporina treće generacije, u širenju ESBL-producirajućih bakterija (54). Opaženo je također da su stacionari u kojima borave starije osobe važan rezervoar ESBL-producirajućih bakterija, i dovode do širenja u bolničku sredinu nakon prijema ovih osoba u bolnicu (23, 59, 130). U populaciji starijih osoba se često propisuju antibiotici, što predstavlja visoki rizik za kolonizaciju ESBL-producirajućim bakterijama (najčešće kolonizacija debelog crijeva) (130). Tako se, u bolničkoj sredini, kolonizirani donji dio probavnog sustava bolesnika smatra najznačajnijim izvorom ESBL-producirajućih bakterija (131). Pojava i širenje ESBL je posljedica mutacije parentalnih TEM-1, TEM-2 i SHV-1 beta-laktamaza koje su vrlo proširene među enterobakterijama. Od tada, mikroorganizmi koji produciraju ESBL su se proširili diljem svijeta (120), a njihov prijenos među

bolesnicima moguć je preko ruku medicinskog osoblja te kontaminiranih dijagnostičkih pomagala, kao što su termometri, ili gelovi koji se koriste pri ultrazvučnoj dijagnostici (131). Širenje ESBL-producirajućih bakterija je naročito izraženo unutar jedinica za intenzivno liječenje, a bolesnici u tim jedinicama su često imunosuprimirani i izloženi invazivnim dijagnostičkim i terapijskim postupcima, što sve doprinosi češćoj kolonizaciji i infekciji (54). Prijenos od bolesnika do bolesnika je dodatno pospješen velikom upotrebom antibiotika širokog spektra u takvim jedinicama, te prezaposlenošću osoblja što vjerovatno dovodi do često neadekvatne primjene mjera za sprečavanje širenja bolničkih infekcija (54). Međutim, u posljednjih nekoliko godina došlo je do širenja infekcija uzrokovanih ESBL sojevima i u vanbolničkoj sredini (121-123).

Prema našim podacima operativni zahvat prilikom predhodnog boravka u bolnici zabilježen je u 16% pacijenata sa infekcijom ESBL-producirajućim bakterijama. Uzrok ovome je najvjerovatnije pojava otpornosti na antibiotike nakon primjene visokih doza antibiotika u postoperativnom tretmanu pacijenta u predhodnom boravku u bolnici, što je jedan od faktora rizika za nastanak infekcije ESBL-producirajućim bakterijama u ponovnom kontaktu pacijenta sa bolničkom sredinom u uvjetima selekcijskog pritiska o čemu piše Sorlózano i sur. (193) kao i drugi autori u istraživanjima provedenim u Indiji (173), Južnoj Koreji (174) i Tajvanu (148).

ESBL-producirajuće bakterije u ovome istraživanju su zabilježene u 87% ($p > 0,05$) pacijenata koji su imali kontakt sa osobom koja je u predhodna 4 mjeseca boravila u bolnici što je u skladu sa podacima drugih autora koji navode da ESBL sojevi enterobakterija su tipični bolnički patogeni a njihovo prenošenje iz bolnice u vanbolničku sredinu je dokazano, naročito kod pacijenata nakon hospitalizacije (118). Ovo je osobito izraženo kod onih pacijenata koji su bili hospitalizirani u jedinicama intenzivne njege a potom otpušteni na kućnu njegu (118,122). Iz ovoga se može zaključiti da kontakt sa osobama koje su predhodno boravile u bolnici spada u jedan od faktora

rizika za stjecanje infekcija ESBL-producirajućim bakterijama što je dokazano i u drugim radovima (148, 173, 174). Naročito je ovaj prijenos moguć kod onih osoba koje su uzimale visoke doze antibiotika (uključujući treću generaciju cefalosporina) prije nego su došle u bolnicu a prije toga imale kontakt sa osobom koja je predhodno boravila u bolnici. Uz to pacijenti su imali umetnut centralni venski ili arterijski kateter, postojanje gastrostome ili jejunostome, plasiran urinarni kateter, hitne intraabdominalne operacije, gastrointestinalnu kolonizaciju, produženi boravak u jedinici intenzivne njege (ICU) ili boravak u bolnici, prethodni boravak u staračkom domu i mehaničku ventilaciju (114).

Sotto i sur. su naveli tri faktora rizika za nastanak infekcija bakterijama koje produciraju ESBL-muški spol, produljena hospitalizacija i prethodna infekcija mokraćnog trakta - dok prethodna terapija kotrimoksazolom nije imala signifikantnog utjecaja na pojavu otpornih sojeva (225).

Analizirajući faktore rizika za razvoj otpornosti *E. coli* prema ciprofloksacinu kod vanbolničkih pacijenata sa infekcijom mokraćnog trakta, Arslan i sur. utvrdili su da muški spol, prisutnost katetera i uzimanje ciprofloksacina više od jednog puta tokom godine dana, pokazuje signifikantnu povezanost sa razvojem rezistencije na ciprofloksacin (226). Lin i sur. rizik razvoja rezistencije u *E. coli* na ciprofloksacin povezuju s upotrebom kinolona unutar dvije sedmice od uzorkovanja urina i kateterom u mokraćnom traktu na dan uzorkovanja urina (146).

U našem istraživanju dobili smo podatak da je 89% bolničkih pacijenata kod kojih je zabilježena infekcija ESBL-producirajućim bakterijama, u predhodna 4 mjeseca koristilo antibiotike, 37% su koristili kortikosteroide, a 32% su imali operativni zahvat tokom hospitalizacije. Drugi autori ne navode povezanost podvrgavanju operativnom zahvatu sa pojavom infekcija sa ESBL-producirajućim bakterijama ali naši podaci su pokazali povezanost operativnog zahvata u toku hospitalizacije sa nastankom ovih infekcija. Sa našeg stajališta može se zaključiti da operacija

predstavlja visoki rizik za stjecanje ovih infekcija u bolničkoj sredini, naročito obzirom da su to kirurški bolesnici.

Kod kirurških pacijenata otvorene rane predstavljaju pogodno tlo za kolonizaciju ESBL-producirajućim bakterijama, kao i snižen nivo odbrambene sposobnosti organizma, prisustvo centralnog venskog ili arterijskog katetera, postojanje gastrostome ili jejunostome, plasiranje urinarnog katetera, hitne intraabdominalne operacije, gastrointestinalna kolonizacija, produženi boravak u jedinici intenzivne njege, što je u skladu sa podacima drugih autora koji navode da su sve ovo čimbenici rizika za nastanak infekcija ESBL-producirajućim bakterijama (114, 148, 173, 174).

Slijedom gore navedenog, potvrđena je naša hipoteza da su čimbenici rizika za nastanak infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama prethodna upotreba antibiotika, osobito cefalosporina proširenog spektra, muški spol, starost iznad 65 godina, te boravak u jedinici intenzivne njege.

6.1.6. Prevalencija ESBL ovisno o vrsti uzročnika

U našem istraživanju najčešći uzročnici izolirani iz različitih infekcija kod bolničkih pacijenata među 1254 Gram-negativnih izolata su bile bakterije *E. coli*, 32%, *K. pneumoniae*, 26%, *Proteus* spp., 16%, i *Citrobacter* spp. , 8% ($p < 0,001$). Najčešći uzročnici izolirani iz različitih infekcija kod izvanbolničkih pacijenata među 2857 Gram-negativnih izolata su bile bakterije *E. coli* 59%, *Proteus* spp. 13%, *Klebsiella* spp. 10%, i *Citrobacter* spp. 10% ($p < 0,001$). Ovim je djelomično potvrđena naša hipoteza da se među gram-negativnim bakterijama ESBL najučestalije izoliraju kod *K. pneumoniae* u bolničkih izolata, odnosno kod *E. coli* kod izvanbolničkih gram-negativnih izolata. U istraživanju provedenom od januara 2003. do septembra 2004. godine kod vanbolničkih pacijenata u Zeničko-Dobojskom kantonu, Uzunović-Kamberović i sur. izvjestili su učestalost

Gram-negativnih uzročnika koji produciraju ESBL, kod *Klebsiella* spp. 8%, *E. coli* 1%, *Citrobacter* spp. 0.6%, *Enterobacter* spp. 8%, i *Proteus* spp. 1% (122).

Rezultati dobijeni u ovome istraživanju nisu u skladu sa izvješćima drugih autora (48, 132, 155). Međutim, nasuprot našim podacima, Marijan i sur. u istraživanju 2010. godine kod vanbolničkih pacijenata u Hrvatskoj su ustanovili prevalenciju ESBL- producirajuće *E. coli* od 1,5%, a 4% kod *K. pneumoniae*, dok je svaka od ove dvije vrste pokazivala drugačiju distribuciju obzirom na dob i spol pacijenata (147).

6.1.7. Antimikrobna otpornost ESBL-producirajućih izolata

U našem istraživanju nije bilo velikih odstupanja u otpornosti na antibiotike kod poređenja bolničkih u usporedbi sa vanbolničkim izolatima. Jedino je imipenem zadržao osjetljivost što je u skladu sa rezultatima autora koji navode da je imipenem lijek izbora u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama (174, 175). U našem istraživanju ESBL-producirajuće *E. coli* su osim na beta-laktamske antibiotike i inhibitore beta-laktamaza, učestalo pokazale otpornost i na sulfometoksazol-trimetoprim i ciprofloksacin (46% i 26%), što je u skladu sa drugim izvještajima (117). U našim rezultatima 89,7% pacijenata kod kojih je izoliran ESBL uzročnik, prethodno je koristilo antibiotike, što je u skladu i sa rezultatima drugih autora koji su ustanovili značajnu povezanost između uzimanja antibiotika prije nastanka i pojave infekcije uzrokovane sa ESBL-producirajućim uzročnicima (48, 148, 173, 174). Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da se radilo o multiplo otpornim sojevima koji su producirali beta – laktamaze proširenog spektra.

Posljednjih godina veliki problem kliničaru i mikrobiologu predstavljaju beta-laktamaze proširenog spektra koje su široko rasprostranjene među enterobakterijama, dominantno u

sojeva *K. pneumoniae* i *E. coli* (200). Ove beta-laktamaze prenose se plazmidima uz čestu istodobnu prisutnost gena za rezistenciju na fluorokinolone, aminoglikozide i suflonamide, što ograničava izbor lijekova u liječenju infekcija ovim bakterijama (200). Osim otpornosti na sve β -laktamske antibiotike (osim na karbapeneme), ESBL-producirajući sojevi su multiplo otporni i na niz drugih antibiotika, najčešće istovremeno na aminoglikozide, trimetoprim–sulfametoxazol i kinolone (53, 122, 227). Prema posljednjim smjernicama CLSI-a (Clinical Laboratory Standard Institute)(2012) ESBL-producirajući sojevi trebali bi se smatrati otpornim na sve beta-laktamske antibiotike, osim karbapenema, neovisno o rezultatima in vitro testiranja (26, 194). Lee DS i sur. u svom istraživanju potvrdili su hipotezu da usljed selektivnog pritiska koji se javlja kod prekomjerne upotrebe cefalosporina treće generacije dolazi do diseminacije ESBL među pripradnicima porodice *Enterobacteriaceae* (173). Cefepim je zadržao dobru djelotvornost sa svega 5,9% rezistentnih sojeva ($p < 0,001$). A od ostalih antibiotika, djelomična osjetljivost se zadržala jedino kod ciprofloksacina (25,7%) ($p = 0,002$). Ostali antibiotici, a među njima i kombinacija amoksicilin+klavulanska kiselina su se smatrali neprikladnim u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama osim ako se ne radi o infekcijama urinarnog trakta kada se mogu koristiti kombinacije beta-laktama i inhibitora beta-laktamaza koje postižu vrlo visoke koncentracije u urinu. (53, 122, 227).

Utvrdivanjem politike propisivanja antibiotika, kontinuiranom edukacijom liječnika, restrikcijom slobodne kupovine antibiotika u ljekarnama predstavljaju efikasne mjere na sprječavanju, prevenciji i kontroli infekcija. U SAD-u su 2001.g. zaključili da je između 20-50% antibiotika propisanih u kliničkoj praksi bilo nepotrebno (228). Statistički podaci iz Kanade pokazuju da

liječnici plaćeni po broju izdanih recepata propisuju antibiotike 5 puta češće od ostalih liječnika (229). U Velikoj Britaniji, dvije studije su pokazale da dvije trećine pacijenata koji su u bolnici dobili antibiotike nisu imali znakove bakterijske infekcije i nisu ih uopće trebali dobiti. (230).

6.2. DRUGI DIO RASPRAVE-prospektivni

U periodu od 01. 12. 2009. do 31. 04. 2010. godine molekularnim metodama PCR i PFGE analizirani su izolati koji su producirali beta-laktamaze proširenog spektra djelovanja.

6.2.1. Prevalencija otpornosti na antimikrobne lijekove

Beta-laktamaze su iznimno raznolike, većina su derivati TEM ili SHV enzima, ali se stalno otkrivaju nove varijante, tako da smo zadnjih godina svjedoci prave eksplozije novih skupina ESBL koje nisu nastale od TEM ili SHV enzima (npr. CTX-M, PER, VEB, GES i sl.) (54). Pojava izolata koji luče ESBL osamdesetih godina prošlog stoljeća, predstavlja odgovor bakterija na široku upotrebu cefalosporina, kao što su ceftazidim i cefotaksim u terapiji (53).

Izolatima koji luče ESBL je svojstveno da su osim na cefalosporine, otporni istovremeno i na druge antimikrobne lijekove, aminoglikozide, kinolone i kotrimoksazol zbog toga što su geni koji kodiraju rezistenciju na te antibiotike često locirani na isom plazmidu kao i gen koji kodira ESBL (49, 53, 150).

Otpornost na cefalosporinske antibiotike (cefuroksim, cefotaksim, ceftazidim i ceftriakson) u bolničkoj i vanbolničkoj sredini u ovom istraživanju se kretala u rasponu od 52% do 100% (MIK_{90~256}), sa nešto većom prevalencijom u bolničkoj sredini. Slični rezultati su zabilježeni u studiji Singha i sur. sa prevalencijom od 30-90% u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini (231). U našoj studiji, u bolničkoj i vanbolničkoj sredini, zabilježili smo visoku otpornost na aminoglikozide (gentamicin), 60-90% (MIK_{90~256}), što je daleko više nego u Španjolskoj, gdje je zabilježena otpornost na gentamicin od 16% (140) ili općenito u Europi, 25% (150). Također

među našim izolatima zabilježena je otpornost i na fluorokinolone (ciprofloksacin) u rasponu 50-60%, što je malo niže u odnosu na rezultate istraživanja u Indiji (81%) (140).

Naši izolati su pokazali 75-100% osjetljivost na imipenem i meropenem ($MIC_{90} \sim 0,25$), što je slično prethodnim rezultatima objavljenim u Bosni i Hercegovini i Indiji (119, 140). Stoga su karbapenemi lijekovi izbora za liječenje infekcija uzrokovani ESBL-producirajućim izolatima. Važno je naglasiti da nekontrolirana primjena karbapenema dovodi do pojave i širenja karbapenemaza pozitivnih sojeva enterobakterija i nefermentativnih bakterija koji su otporni najčešće na sve antibiotike osim kolistina i predstavljaju veliki terapijski problem.

Međutim, među izolatima *Acinetobacter* spp. pored visoke otpornosti na cefalosporine, zabilježena je i otpornost na karbapeneme (33% na meropenem i 100% na imipenem; $MIC_{90} \sim 128$), vjerojatno zbog produkcije karbapenem hidrolizirajućih-oksacilinaza iz grupe D. Slični rezultati su objavljeni širom Europe (150), u Brazilu 70% (232).

Međutim posljednjih nekoliko godina, uz pojačanje intervencija kontrole infekcija, u Francuskoj je zabilježeno smanjenje prevalencije infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim izolatima *K. pneumoniae* (233). Važno je napomenuti, da dok se udio ESBL-producirajućih izolata *K. pneumoniae* smanjuje u nekim dijelovima zapadne Europe, u državama Istočne Europe je u porastu (234).

U borbi protiv širenja beta-laktamaza producirajućih izolata u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, bitno je uvesti i nadgledati higijenske mjere, te uvesti edukaciju zdravstvenih radnika o značajnosti ESBL izolata, kao i povećati restrikciju slobodne kupovine antibiotika.

6.2.2. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod *E. coli* u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini

Od 11 bolničkih beta-laktamaza producirajućih izolata *E. coli*, 63% je bilo pozitivno na CTX-M beta-laktamaze, 45% sa TEM i OXA i 27% SHV. Sekvencioniranjem je utvrđena prisutnost beta-laktamaza širokog spektra tipa TEM-1 i OXA-1 kod 100% i SHV-1 kod 66% sojeva, a od ESBL utvrđena je produkcija SHV-5 beta-laktamaze u 33% izolata. U Bosni i Hercegovini nisu evidentirani rezultati o tipizaciji beta-laktamaza kod izolata *E. coli*, osim u izvještaju iz 2007. godine o prvoj detekciji SHV-5 u tri ESBL-producirajuća izolata *E. coli* (118). Među CTX-M beta-laktamazama proširenog spektra, dominirala je CTX-M-15 beta-laktamaza pronađena u 57% izolata. U poređenju sa rezultatima iz Belgije 2007. godine prevalencija CTX-M-15 beta-laktamaza u bolničkoj sredini iznosila je svega 25% (235). *Bla*_{CTX-M} danas je mnogo učestaliji kod *E. coli* u vanbolničkoj sredini i mogući razlog je primjena ceftriaksona u terapiji, fekalni prenos ili prenos gena horizontalnom transmisijom (4, 236, 237, 238).

Od 19 izvanbolničkih beta-laktamaza producirajućih izolata *E. coli*, 58% produciralo je TEM beta-laktamaze, 52% CTX-M, 21% SHV i 16% CMY-2. Sekvencioniranjem je utvrđena prisutnost beta-laktamaza širokog spektra TEM-1 i SHV-1 u 100% slučajeva. Među CTX-M beta-laktamazama proširenog spektra, dominira CTX-M-15 beta-laktamaza u 70% slučajeva. Općenito beta-laktamaze proširenog spektra u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini pripadale su CTX-M (CTX-M-3 i CTX-M-15) porodici, koja je dominantna u Europi (239). Epidemiološke studije pokazuju da su neki enzimi zastupljeniji u odnosu na druge, što ovisi od geografskog područja, te da postoje različite varijacije u prisutnosti CTX-M grupe beta-laktamaza unutar jedne zemlje (240), što je i slučaj sa našom studijom sa prisutnošću CTX-M-3 i CTX-M-15 beta-laktamaza. U Makao, 2010. godine produkcija CTX-M-9 beta-laktamaza iznosila je 87% (241), što je kontradiktorno sa

našom studijom. U Pakistanu 2005. godine prevalencija CTX-M-15 beta-laktamaza iznosila je 75% (242), dok je u Kanadi dominirala produkcija CTX-M-14 (41).

CTX-M-15 beta-laktamaza izolovana iz *E. coli* postaje svjetski problem (6). U Europi još od 1997. godine dominiraju CTX-M beta-laktamaze iz grupe 9 (CTX-M-9 i CTX-M-14) i grupe 1 (CTX-M-3 i CTX-M-15) (243).

Mnoge studije iznose razloge povećane prevalencije CTX-M beta-laktamaza, a jedna od njih je upotreba cefalosporina treće generacije u terapiji infekcija, osobito ceftriaksona (244).

U istraživanju je po prvi put zabilježena prevalencija od 16% plazmidnih AmpC beta-laktamaza u izvanbolničkoj sredini, te sekvencioniranjem utvrđena CMY-2 beta-laktamaza, što je slično sa nekim svjetskim rezultatima.

Dva mehanizma mogu dovesti do povećane produkcije kromosomskih AmpC beta-laktamaza.

Jedan način je indukcija u prisutnosti određenih beta-laktamskih antibiotika. Potentni induktori ovih beta-laktamaza su cefoksitin, klavulanska kiselina i imipenem, iako svi cefalosporini mogu inducirati do određenog stupnja produkciju ovih 16 enzima. U usporedbi s imipenemom, meropenem ima manji indukcijski potencijal za AmpC beta-laktamaze. Unatoč činjenici da je potentni induktor, imipenem je stabilan u prisutnosti povišene produkcije AmpC beta-laktamaza, što ga razlikuje od ostalih betalaktamskih antibiotika. Drugi mehanizam za ekspresiju konstitutivnih AmpC beta-laktamaza je selekcija mutanti sa mutacijom ampD gena koji kodira enzimski represor AmpC. Ove mutante imaju visoku produkciju AmpC beta-laktamaza i u odsutnosti bilo kojeg antibiotika (induktora).

U zadnje vrijeme zabilježene su AmpC beta-laktamaze prenosive plazmidima (označene su obično kao AmpC-p). Mogućnost kodiranja AmpC beta-laktamaza na mobilnim genetičkim elementima može dovesti do diseminacije rezistencije na antibiotike na različite sojeve mikroorganizama, što je potvrđeno njihovim pronalaskom u mikroorganizmima koji nemaju konstitutivni, kromosomski AmpC gen. Ti mikroorganizmi uključuju *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli* i *P. mirabilis* (74). Za razliku od kromosomski kodiranih, AmpC beta-laktamaze kodirane na plazmidima nisu inducibilne.

U Indiji 2011. godine zabilježena je prevalencija pAmpC beta-laktamaza od 15,9% (245), u Kanadi 2003. godine iznosila je 34% (246), dok je u Holandiji zabilježena niska prevalencija od 1,3% (247). U izvještajima iz Kanade, Europe i SAD, CMY-2 beta-laktamaza je najzastupljenija plazmidna beta-laktamaza kod *E. coli* (248).

Pojava i distribucija beta-laktamaza se razlikuje od jedne države do druge kao i od bolnice do bolnice (9). Preporuka je da laboratorijski radnici urade potvrdne testove za produkciju beta-laktamaza kod sojeva rezistentnih disk-difuzijskom metodom na cefalosporine treće generacije. Preporuka upotrebe cefotaksima, ceftazidima i ceftriaksona kao jedinih pokazatelja moguće produkcije beta-laktamaza u testu je odbačena, te se preporučuje upotreba cefpodoksima kao najboljeg antibiotika za detekciju izolata koji luče beta-laktamaze u kliničkim uzorcima (249).

PFGE analiza naših izolata je pokazala da je samo manji broj izolata pripadao istom klonu. Osamnaest bolničkih i izvanbolničkih izolata svrstano je u četiri klona. Klonovi A i C su najbrojniji, sadrže po tri izolata, izolovana u vremenu od siječnja do ožujka 2010. Klonska sličnost izolata upućuje na to, da su neki sojevi vjerojatno bolnički preneseni na bolesnike iz nekog

vanjskog izvora (kontaktom sa koloniziranim instrumentima), te da nisu bili dio endogene flore bolesnika (250).

6.2.3. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata *Klebsiella* spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini

U našem istraživanju od 51 bolnička ESBL-producirajuća izolata *Klebsiella* spp., 84% produciralo je CTX-M beta-laktamaze, 72% TEM, 61% SHV, 41% OXA i 8% plazmidne AmpC beta-laktamaze. Među beta-laktamazama širokog spektra sekvencioniranjem je utvrđena prevalencija od 100% slučajeva tipa TEM-1 i OXA-1, te 97% tipa SHV-1. bla_{TEM-1} , bla_{SHV-1} i bla_{OXA-1} su vjerojatno pridruženi ili samostalni geni na istom plazmidu sa bla_{CTX-M} (23, 50, 121, 167, 193, 194).

Među CTX-M beta-laktamazama, preovladavala je prevalencija CTX-M-15 od 63% slučajeva, što je malo viša prevalencija u odnosu na rezultate iz Slovenije, gdje je 2006. godine zabilježena produkcija od 32% CTX-M-15 beta-laktamaza kod ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. (251). U Bosni i Hercegovini 2010. godine utvrđena je prevalencija CTX-M-15 od 69% kod ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. (119). U Turskoj 2007. godine zabilježeno je 7% slučajeva CTX-M-15 kod ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp., što je kontradiktorno sa našom studijom (252). beta-laktamaze iz CTX-M porodice pronađene kod bolničkih ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. su bile : CTX-M-28 (2%), CTX-M-3 (5%) i CTX-M-1 (30%) sojeva. Studija se podudara sa izvještajima Livermora i Woodforda, 2006. da u jednoj zemlji postoje različiti tipovi CTX-M beta-laktamaza iz familije CTX-M (240).

U svijetu su rijetki izvještaji o produkciji beta-laktamaza tipa CTX-M-28.

Dva izolata u našem istraživanju su producirali CTX-M-3 enzim koji spada u CTX-M-1 grupu enzima. Ova grupa enzima uključuje CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23 i CTX-M-28 enzime. Ovi enzimi su opisani u našim susjednim zemljama, Italiji (253), Mađarskoj (254), kao i u drugim zemljama mediteranskog područja (Grčka, Turska) (43). Ovo je prva zabilježena CTX-M-3 beta-laktamaza u BiH, a prvi put je opisana 1998. godine u Poljskoj (66), zatim u Francuskoj (255), Japanu (256), Tajvanu (257), Grčkoj (258), Kini (259) i Engleskoj (260).

U Brazilu 2008. i u Indiji 2007. godine zabilježen je po jedan ESBL-producirajući izolat *Klebsiella* spp. koji je producirao CTX-M-28 beta-laktamazu (261, 262). Ova beta-laktamaza se razlikuje od CTX-M-3 u jednom nukleotidu (A750-G750), a uzrok raznolikosti CTX-M beta-laktamaza su točkaste mutacije blaCTX-M gena što rezultira u zamjeni aminokiselina u polipeptidnom lancu (262).

Među bolničkim ESBL-producirajućim izolatima *Klebsiella* spp. utvrđena je prisutnost plazmidnih AmpC beta-laktamaza u 8% izolata, te su sekvencioniranjem identificirane CMY-2 i DHA-1 u 4% izolata. Nisu zabilježeni rezultati studija o prisutnosti pAmpC beta-laktamaza u Bosni i Hercegovini, te u poređenju sa drugim zemljama, prevalencija je niska. U Turskoj 2011. godine je zabilježena prevalencija od 18,4% pAmpC beta-laktamaza (245). U Kini 2005. godine iznosila je 4,3% sa dominirajućom sekvencom DHA-1 u odnosu na CMY-2 kod izolata *Klebsiella* spp. (263). AmpC beta-laktamaze u svijetu predstavljaju sve veći problem iz razloga što mogu biti kromosomski i plazmidno kodirane, a kod liječenja infekcija uzrokovanim plazmidnim ampC beta-laktamaza producirajućim izolatima *Klebsiella* spp. može doći do terapijskog neuspjeha (264). Za razliku od ESBL može se u terapiji koristiti cefepim koji ne podliježe hidrolizi kromosomskim i plazmidnim ampC beta-laktamazama.

Od 28 izvanbolnička ESBL-producirajuća izolata *Klebsiella* spp., 43% sojeva je produciralo TEM, 21% CTX-M i SHV, 14% OXA i 4% plazmidne AmpC beta-laktamaze. Među porodicama enzima TEM i SHV, sekvencioniranjem utvrđena je produkcija TEM-1 i SHV-1 beta-laktamaza širokog spektra, dok je među CTX-M enzimima dominirala CTX-M-15 beta-laktamaza, detektirana u 83% izolata. Martinez i sur. iz Kolumbije su zabilježili prevalenciju CTX-M-1 beta-laktamaza od 75% među ESBL-producirajućim izolatima *Klebsiella* spp. u vanbolničkoj sredini (265). Pored CTX-M-15 beta-laktamaza, u našoj studiji prvi put opisana CTX-M-22 u 17% izolata. Rijetki su izvještaji, pogotovo u izvanbolničkoj sredini o produkciji CTX-M-22 enzima, no naša studija se podudara sa izvještajima Gulambara i sur. o zastupljenosti CTX-M-22 u Turskoj od 17% ESBL-producirajućih izolata *Klebsiella* spp. (252).

Molekularna karakterizacija PFGE-metodom je pokazala da je samo manji broj izolata klonski srodan. Ukupno četrdeset i jedan bolnička i izvanbolnička ESBL-producirajuća izolata svrstana su u četrnaest klonova. Klonovi H i LJ su najbrojniji, sadržavali su po pet izolata, izolovana u vremenu od siječnja do travnja 2010. Klonska sličnost izolata upućuje na to, da su neki sojevi vjerojatno bolnički preneseni na bolesnike iz nekog vanjskog izvora (kontaktom sa koloniziranim instrumentima), te da nisu bili dio endogene flore bolesnika (250). Suzbijanje ESBL sojeva nameće potrebu učinkovitije primjene protokola za kontrolu bolničkih infekcija, koje uključuju mjere izolacije bolesnika nosioca ESBL izolata i dekontaminacije okoliša (250).

6.2.4. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata *E. cloacae* u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini

Enterobacter cloacae je bolnički patogen, koji može uzrokovati razne infekcije, kao što su bakterijemije, infekcije respiratornog trakta, infekcije kože i mekih tkiva, urinarne infekcije, endokarditis, intraabdominalne infekcije, septični artritis, osteomijelitis i sl. (266).

U našoj studiji prvi put izvještavamo o molekularnoj karakterizaciji beta-laktamaza u izolatima *Enterobacter cloacae* u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini u Bosni i Hercegovini. Od osam i tri bolnička i izvanbolnička beta-laktamaza producirajuća izolata *E. cloacae*, 50% odnosno 67% produciralo je TEM, 37% odnosno 67% CTX-M, i 25% i nula SHV, 12% . U 67% bolničkih i 12% izvanbolničkih izolata dokazana je produkcija OXA beta-laktamaza. Sekvencioniranjem TEM i SHV beta-laktamaza, utvrđeno je da svi blaTEM i blaSHV pozitivni sojevi produciraju TEM-1 odnosno SHV-1 beta-laktamazu, a u bla_{CTX-M} pozitivnih identificirane su CTX-M-1, CTX-M-15 i CTX-M-28 beta-laktamaza, u 33% sojeva svaka. U Velikoj Britaniji, 2002. godine od 15 ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae*, izolovanih iz uzoraka krvi (septikemija), 33% produciralo je SHV-2 i SHV-5 beta-laktamaze (267). U Holandiji 2007. godine, 14% (37/271) izolata *E. cloacae* produciralo je ESBL, od toga 54% CTX-M-9 i 38% SHV-12 beta-laktamazu (268). Towner i sur. 2010. godine izvještavaju da među devet ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae*, 89% slučajeva produciralo je SHV-12, a niti jedan CTX-M ili TEM beta-laktamazu, što je kontradiktorno sa rezultatima naše studije (269). U Kini 2013. godine utvrđena je prevalencija CTX-M beta-laktamaza od 48% u ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae* u bolničkoj sredini (270). Također, u Japanu 2012. godine Kanamori i sur. izvještavaju o prevalenciji CTX-M beta-laktamaza od 41% kod ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae* (271).

U našoj studiji prvi put je na prostorima Bosne i Hercegovine dokazana produkcija plazmidnih AmpC beta-laktamaza tipa CMY-2 sa prevalencijom od 12% u izolata *E. cloacae* rezistentnim na novije cefalosporine. U Alžiru 2009. godine zabilježena je prevalencija pAmpC beta-laktamaza tipa DHA-1 od 15,0% slučajeva ESBL-producirajućih izolata *E. cloacae* (272), dok Bedenić i sur. 2010. godine izvještavaju da u Hrvatskoj nisu zabilježene plazmidne AmpC beta-laktamaze u izolatima *E. cloacae* (273).

Molekularna karakterizacija pomoću PFGE je pokazala da je manji broj sojeva klonski srodan. Deset bolničkih i izvanbolničkih izolata svrstano je u jedan klon (A) sa četiri izolata dok su ostali singleton sojevi. Klon A sastoji se od tri izvanbolnička i jednog bolničkog izolata, prosječne dobne starosti 65 godina, što je vjerojatno posljedica prethodne hospitalizacije, kirurškog zahvata ili neracionalne primjene antibiotika u terapiji, što se podudara sa drugim izvještajima (266).

6.2.5. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata *Proteus* spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini

Prema rezultatima ovoga istraživanja od pet bolničkih i šest izvanbolničkih beta-laktamaza producirajućih izolata *Proteus* spp., 4 odnosno 1 izolat produciralo je CTX-M beta-laktamaze, 3 odnosno 1 izolat OXA, 2 bolnička i izvanbolnička TEM, nula i jedan SHV i po jedan izolat sa produkcijom plazmidne AmpC beta-laktamaze. Iako je apsolutni broj ovih izolata malen, ipak je važno spomenuti da je ovo prva tipizacija ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. u Bosni i Hercegovini. U poređenju sa drugim zemljama, u Italiji od svih ESBL-producirajućih izolata, *Proteus* spp. je najzastupljeniji u izvanbolničkoj sredini, kao glavni uzročnik infekcija mokraćnog sistema (274-276), dok je u Francuskoj, 2005. godine zabilježena niska prevalencija ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. (37%) (277). Alabi i sur. 2013. godine su zabilježili u Nigeriji visoku prevalenciju TEM beta-laktamaza širokog spektra, a niska prevalencija 3% CTX-M-15 beta-laktamaza (278), slično rezultatima iz našega istraživanja o ESBL-producirajućim izolatima *Proteus* spp. U istoj studiji SHV beta-laktamaze nisu identificirane (278). U zemljama regije, kao što je Hrvatska, 2010. godine zabilježena je pojava TEM-52 od 21% ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. (279), što je kotradiktorno našoj studiji. U odnosu na prethodne zemlje, uključujući i našu, na dalekom Istoku, u Japanu od 105 ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. svi su

producirali CTX-M-2 beta-laktamazu (280), dok je u Tajvanu 2005. godine pored CTX-M-2 zabilježena produkcija CTX-M-3, CTX-M-14, CTX-M-24 i CTX-M-66 beta-laktamaza (281).

U našoj studiji, u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, zabilježena je produkcija plazmidnih AmpC beta-laktamaza, tipa CMY-2 beta-laktamaze od 20% odnosno 17% slučajeva. Rezultati studije u SAD-u 2006. godine pokazali su nisku prevalenciju od 1% pAmpC beta-laktamaza izolovanih iz ESBL-producirajućih izolata *Proteus* spp. U istoj studiji od pet pAmpC beta-laktamaza, četiri su bile CMY-2 i jedan FOX enzim (282).

PFGE analiza u našem istraživanju nije pokazala klonsku povezanost među beta-laktamaza producirajućim izolatima *Proteus* spp. Od 11 bolničkih i izvanbolničkih izolata po dva izolata su svrstana u dva klona (A i B). Klon A se sastojao od dva izvanbolnička soja i klon B od dva bolnička izolata. Znači, genotipizacijom nismo ustanovili genetsku srodnost. Međutim, u mnogim zemljama postoje izvješća o klonskom širenju ESBL-kodirajućih gena među izolatima *Proteus* spp. pogotovo *bla*_{TEM-24} u nekim europskim državama (283-285).

6.2.6. Prevalencija tipova beta-laktamaza kod izolata *Acinetobacter* spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini

Od 10 bolničkih i 3 izvanbolničkih izolata *Acinetobacter* spp., osam odnosno tri izolata produciralo je TEM beta-laktamaze, šest odnosno jedan oksacilinaze i dva odnosno jedan izolat CTX-M i OXA beta-laktamaze. U ovome istraživanju prvi put u BiH je opisana karakterizacija mehanizama otpornosti u *Acinetobacter* spp. Sekvencioniranjem TEM producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. utvrđena je produkcija TEM-1 od 100% slučajeva, bez produkcije beta-laktamaza proširenog spektra iz porodice TEM. U Italiji, 2007. godine Endimiani i sur. su opisali prvu detekciju beta-laktamaza proširenog spektra djelovanja iz porodice TEM (TEM-92) kod

ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. u 6% izolata (31/470) (286). Izvješća u svijetu pokazuju da izolati *Acinetobacter* spp. produciraju razne beta-laktamaze proširenog spektra djelovanja, kao što su: PER-1 izolovanim u Belgiji, Francuskoj, Turskoj i Koreji (287-290), PER-2 u Argentini (291), VEB-1 u Belgiji, Argentini i Francuskoj (287, 291, 292, 293), SHV-12 u Kini (294) i CTX-M tip u Boliviji i Japanu (295, 296).

U ovome istraživanju molekularnom tipizacijom beta-laktamaza producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, utvrđena je produkcija CTX-M beta-laktamaza grupe 1 (20% odnosno 34%). U Indiji 2010. godine rezultati pokazuju produkciju CTX-M-15 i TEM-150 kod beta-laktamaza producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. (297), što potvrđuje raznolikost produkcije ESBL ovisno od geografskog područja (246). U Japanu 2004. godine zabilježena je produkcija CTX-M-2 beta-laktamaza dobijenih iz izolata *Acinetobacter* spp., a koja je slična CTX-M-2 beta-laktamazi, izolovanoj neposredno prije u istom mjestu iz beta-laktamaza producirajućih izolata *Proteus* spp. (296), što opet dokazuje mogućnost plazmidnog prenosa gena između gram-negativnih bacila, uključujući članove porodice *Enterobacteriaceae* (43, 53) i glukoza non-fermentore, kao što je *Pseudomonas aeruginosa* (253).

Prema molekularnoj klasifikaciji postoje beta-laktamaze grupe D u koje spadaju oksacilinaze (298) i opisane su širom svijeta: OXA-23 potječe iz Škotske (299), OXA-24 i OXA-25 iz Španjolske (300, 301), OXA-26 iz Belgije (301) i OXA-27 iz Singapura (301).

U našem istraživanju prvi put je zabilježena produkcija *bla*_{OXA-51}, kao urođene oksacilinaze u 60% odnosno 34% slučajeva kod ESBL-producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini. Ovaj tip oksacilinaze ukazuje nam na zastupljenost vrste *Acinetobacter*

baumanii unutar iste vrste. Nažalost, u odnosu na rezultate drugih studija, nismo izolovali stečene oksacilinaze drugih tipova (OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-148 i dr.). U poređenju sa drugim zemljama, Karah 2011. godine u svojoj studiji izvještava o prevalenciji produkcije oksacilinaza kod beta-laktamaza producirajućih izolata *Acinetobacter* spp. i to: 16% *bla*_{OXA-23}; 7% *bla*_{OXA-58} i 2% *bla*_{OXA-24} (302). U Teheranu 2008. godine zabilježena je produkcija *bla*_{OXA-51} od 100% uz kombinaciju gena *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-23} (25%) i *bla*_{OXA-51}/*bla*_{OXA-24} (18%) (303). U Brazilu 2012. godine detektirana je produkcija OXA-23 oksacilinaze od 95% slučajeva (304), dok je u Sjevernoj Koreji 2005. godine dominirala produkcija *bla*_{OXA-23} i *bla*_{OXA-51} (305). U susjednim zemljama, interesantan je izvještaj o prvoj detekciji gena *bla*_{OXA-72} u Hrvatskoj, 2008. godine (od 34 beta-laktamaza producirajuća izolata *Acinetobacter* spp., 33 je produciralo OXA-72 enzim) (306). Na dalekom zapadu, u SAD-u 2008/09. godine zabilježena je 100%-na prevalencija *bla*_{OXA-23} i *bla*_{OXA-51} (307).

PFGE analiza nije pokazala klonsku sličnost među beta-laktamaza producirajućim izolatima *Acinetobacter* spp. Od četiri bolnička i vanbolnička izolata dva izolata su svrstana u jedan klon (A), i to dva bolnička izolata (Odjel za neurologiju i Odjel za onkologiju), pacijenata dobne starosti 53 i 54 godine. Međutim, u mnogim zemljama postoje izvješća o klonskom širenju beta-laktamaza kodirajućih gena među izolatima *Acinetobacter* spp. (286, 296, 306).

7. ZAKLJUČCI

U ovome istraživanju glavne pretpostavke zasnovane su na činjenici da je učestalost infekcija uzrokovanih sojevima koji proizvode beta - laktamaze proširenog spektra (ESBL) veća u bolničkoj nego u vanbolničkoj sredini, da se među gram-negativnim bakterijama ESBL najučestalije izoliraju kod *K. pneumoniae* u bolničkih izolata, odnosno kod *E. coli* kod vanbolničkih gram-negativnih izolata, da su čimbenici rizika za nastanak infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama prethodna upotreba antibiotika, osobito cefalosporina proširenog spektra, muški spol, starost iznad 65 godina, prisutnost katetera, prisutnost drugih oboljenja (dijabetes, insuficijencija bubrega, maligne bolesti), boravak u jedinici intenzivne njege; te da postoji značajna povezanost učestalosti infekcija beta – laktamazama proširenog spektra sa pojavom otpornosti na antibiotike.

Na osnovu rezultata istraživanja proizilaze sljedeći zaključci:

1. Prevalencija izolata koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) među gram-negativnim bakterijskim sojevima u Zeničko-Dobojskom kantonu je bila veća kod bolničkih nego kod vanbolničkih pacijenata, 10,0% odnosno 6,4%;
2. Učestalost ESBL-producirajućih sojeva najzastupljenija je u uzorcima opekotina kod bolničkih pacijenata dok su kod vanbolničkih pacijenata ESBL-producirajući sojevi najučestalije izolirani iz uzoraka hirurških rana;
3. Kod bolničkih pacijenata učestalost ESBL-producirajućih sojeva je bila veća kod muškaraca a kod vanbolničkih pacijenata učestalost je bila veća kod žena;
4. Prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na dob pacijenata, bila je najveća u osoba starijih od 65 godina kako kod bolničkih tako i kod vanbolničkih pacijenata;
5. Prevalencija ESBL-producirajućih bakterija u odnosu na mjesto stanovanja je bila najveća kod

pacijenata koji su dolazili iz općine Zenica;

6. Učestalost ESBL sojeva je bila najveća kod onih pacijenata koji su prije prijema u bolnicu boravili kod kuće;

7. Predhodni boravak u bolnici nije ustanovljen kao čimbenik rizika za nastanak infekcija ESBL-producirajućim sojevima;

8. Pacijenti koji su predhodno boravili u bolnici najučestalije su bili liječeni na odjelima koji u sastavu svoga djelovanja imaju intenzivnu njegu;

9. Operativni zahvat u predhodnom boravku u bolnici nije ustanovljen kao čimbenik rizika za nastanak infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim sojevima;

10. Najučestalija izolacija ESBL-producirajućih sojeva zabilježena je kod onih bolničkih pacijenata koji su prethodno bili u kontaktu sa bolesnicima koji su već bili nosioci infekcije ESBL-producirajućih sojeva;

11. Učestalost infekcija ESBL-producirajućim sojevima nije bila povezana sa operativnim zahvatom osoba u trenutnoj hospitalizaciji;

12. Najučestalije izolirane bakterije među gram-negativnim izolatima koje produciraju ESBL su bile *Klebsiella* spp. i *E. coli* kako kod bolničkih tako i kod izvanbolničkih pacijenata;

13. Predhodna upotreba antibiotika je ustanovljena kao čimbenik rizika za nastanak infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim sojevima;

14. Amoksiclin+klavulanska kiselina (20/10 µg) i cefepim (30 µg) su relativno dobro očuvali osjetljivost prema ESBL-producirajućim sojevima dok su amoksicilin (20 µg), cefaleksin (30 µg), cefuroksim (30 µg) i ostali antibiotici iz grupe cefalosporina proširenog spektra bili otporni na djelovanje gram-negativnih bakterija koje produciraju ESBL;

15. ESBL-producirajući izolati su bili vodeći uzročnici infekcija na odjelima za dječije bolesti, neurološke i kirurške bolesti;
16. ESBL- producirajući izolati su najviše izolovani iz mokraće i briseva kirurških rana;
17. Tipizacijom je ustanovljena vodeća prevalencija CTX-M-15 beta-laktamaza;
18. Prvi put na prostorima Bosne i Hercegovine dobivene su sekvence gena ESBL: CTX-M-3 i CTX-M-28;
19. Od plazmidnih AmpC beta-laktamaza na prostorima BiH, prvi put su izolovane CMY-2 i DHA-1 beta-laktamaze kod bakterija pripadnika porodice Enterobacteriaceae;
20. Među izolatima *Acinetobacter* spp. izolovane su urođene oksacilinaze *bla*_{OXA-51};
21. Metodom PFGE nije utvrđena značajnija klonska pripadnost među ESBL-producirajućim izolatima;

8. LITERATURA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twentieth Informational Supplement, CLSI Document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
2. Friedman C, Callery S, Jeanes A, Piaskowski P, Scott L. Best Infection Control Practices for Patients with Extended Spectrum Beta Lactamase Enterobacteriaceae. International Infection Control Council, 2005.
3. Agrawal P, Ghosh A, Kumar S, Basu B, Kapil K. Prevalence of extended spectrum β -lactamases among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates in tertiary care hospital. Indian J Pathol Microbiol 2008; 51(1):139-42.
4. Pitout JDD, Laupland KB. Extended Spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae : an emerging public health concern. Lancet infect Dis 2008; 8:159-66.
5. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious *R* Factors In Enterobacteriaceae Nature 1965; 208:239-41.
6. Hawkey PM. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. Clin Microbiol Infec 2008; 14:159-65.
7. Rupp ME and Paul D. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL). Producing Enterobacteriaceae. Drugs 2003; 63(4):353-56.
8. Girlich D, Naas T and Nordmann P. Biochemical Characterization of the Naturally Occuring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(6):2043-48.

9. Ali AM. Frequency of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing Nosocomial Isolates In A Tertiary Care Hospital In Rawalpindi. *J R Army Med Corps* 2009; 3:0030-9648.
10. Al-Charrakh AH, Yousif SY and Al- Janabi HS. Occurrence and detection of Extended Spectrum β -lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq, *African J Biotechnol* 2011; 10(4):657-65.
11. Nasehi L, Shahcheraghi F, Nikbin VS, Nematzadeh S. PER, CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2010; 13(3):111-8.
12. Sharma J, Sharma M and Roy P. Detection of TEM and SHV genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. *Indian J Med* 2010; 132:332-6.
13. Rahman MM, Haque JA, Hossain MA, Sultana R, Islam AHMF, Islam S. Prevalence of extended spectrum beta lactamase-producing *Escheria coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka Bangladesh. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24(5):508-10.
14. Haque R, Salam MA. Detection of ESBL producing nosocomial gram negative bacteria from a tertiary care hospital in Bangladesh, *Pk. J Med Sci* 2010; 26(4):887-91.
15. Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D and Sirot J. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β -lactamases from Enterobacteriaceae Isolated in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2):534-7.

16. Ensor VM, Shahid M, Evans JT and Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:1260-3.
17. Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta lactamases among Enterobacteriaceae with their *in vitro* antimicrobial susceptibility. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(2):161-4.
18. Lal P, Kapil A, Das BK and Sood S. Occurrence of TEM and SHV gene in extended spectrum beta lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella spp.* isolated from a tertiary care hospital. *Indian J Med* 2007; 125:173-8.
19. Peirano G, Pitout JDD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -Lactamases : worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:316-21.
20. Sabate M, Navarro F, Miro E, Canpony S, Mirelis B, Barbe J, Prats G. Novel complex sul-type integron in *Escherichia coli* carrying bla (CTX-M-9). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2656-61.
21. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.
22. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *BMJ* 2003; 327:1209-13.
23. Bedenić B. β -lactamase u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji. *Liječ Vjes* 2004; 126:314-24.

24. Sykes BR, Matthew M. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2:115-57.
25. Medeiros AA. B-lactamases *Brit Med Bull* 1984; 40:18-27.
26. Bradford PA. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):933-51.
27. Wu PJ, Shannon K, Phillips I. Effect of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:494-8.
28. Lacey RW. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *streptococci*. *Brit Med Bull* 1984; 40:77-83.
29. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-7.
30. Matthew M. Plasmid-mediated β -lactamases of gram-negative bacteria properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5:349-58.
31. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boufgras JM, Sanders WE Jr. Ability of the VITEK Advanced Expert system to identify β -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000; 47:273-95.

32. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 6:315-7.
33. Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S. Drug resistance of enteric bacteria. Comparison of β -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to α -aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol* 1968; 12:423-34.
34. Jack GW, Richmond MH. A comparative study of eight distinct β -lactamases synthesized by gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol* 1970; 61:43-61.
35. Richmond MH, Sykes RB. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9:31-88.
36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
37. Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:259-76.
38. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004; 155:409-21.
39. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; 289:321-31.
40. Jaurin B, Grundstrom T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has different evolutionary origin from that of β -lactamases of penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:4897-901.

41. Zhanel GG, Decorby M, Nichol KA, Baudry PJ, Karlowsky JA, Lagace-Wiens PR, McCracken M, Mulvey MR, Hoban DJ. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in intensive care units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study (2005-2006). *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2008; 19(3):243-9.
42. Kenneth TS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2):333-6.
43. Bonnet R. Growing of extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1):1-14.
44. Gniadkowsky M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:597-608.
45. Goussard S, Courvalin P. Updated sequence information for TEM beta-lactamases genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:367-70.
46. Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM. Clinical and molecular epidemiology of healthcare-associated infections due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that harbor multiple ESBL genes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:1026-34.
47. Chaubey VP, Pitout JD, Dalton B, Ross T, Church DL, Gregson DB, Laupland KB. Clinical outcome of empiric antimicrobial therapy of bacteremia due to extended-spectrum

- beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. BMC Res Notes 2010; 3:116.
48. Sorlozano A, Gutierrez J, Palanca M, Soto MJ, Piedrola G. High incidence of extended-spectrum β -lactamases among outpatient clinical isolates of *Escherichia coli*: A phenotypic assessment of NCCLS guidelines and a commercial method. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50:131-4.
49. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G, and The Italian ESBL Study Group. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae in Italy: Implications for Resistance to β -Lactam and Other Antimicrobial Drugs. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(1):196-202.
50. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. J Chemother 1998; 10:449-59.
51. Cormican M, Morris D, Corbett-Feeney G, Flynn J. Extended-spectrum beta-lactamase production and fluoroquinolone resistance in pathogens associated with community-acquired urinary tract infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 32:317-9.
52. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbio Rev 2005; 18:657-86.
53. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.

54. Sturenberg E, Mack D. Extended spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* 2003; 47:273-95.
55. Chaibi EB, Sirot D, Paul G and Labia R. Inhibitor-resistant TEM- β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 447-58.
56. Henquell C, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:427-30.
57. Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1499-505.
58. Prinarhis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gozouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
59. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rassmusen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. SHV-7, novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:899-905.

60. El-Harrif-Heraud Z, Arpin C, Benliman C, Quentin C. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4 producing strains of *Citrobacter diversus*. J Clin Microbiol 1997; 35:2561-7.
61. Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronco E, Nordman P. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1281-4.
62. Bush K, Macalintal C, Rassmusen BA, Lee VJ, Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:851-8.
63. Humaniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Klyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-ancoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3045-9.
64. Tzouvelakis LS, Tzelepi E, Tassiou PT, Legakis NJ. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14:137-43.
65. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Rohnisch T, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. Infection 1992; 20:158-63.
66. Gniadkowski M, Schneider I, Palucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B and Bauernfeind A. Cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:827-32.

67. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. 2005, Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(5):21-4.
68. Naas T, Nordman P. OXA –type beta-lactamase isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:785-90.
69. Wikipedia, 2010, Beta-lactamase. Accessed on December 10, 2010.
70. Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 3:962-9.
71. Vahaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, Ozturk R, Soyletir G, Yildirim I, Avkan V. Chracterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: Molecular epidemiology of PER-1 producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2942-6.
72. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordman P. Molecular characterization of In50. A class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 176:411-9.
73. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L. TLA-1: a new plasmid mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:997-1003.
74. Yang K, Guglielmo BJ. Diagnosis and Treatment of Extended-Spectrum and AmpC beta-Lactamase-producing Organisms. *Ann Pharmacoth* 2007; 41:1427-35.

75. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380-91.
76. Poirel L, Thomas IL, Naas T et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:622-32.
77. Rhee YJ, Park YK, Lee MY, Peck KR, Soo KK. KPC-Producing Extreme Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from a patient with Diabetes Mellitus and Chronic Renal Failure on Haemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(5):2278-9.
78. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:755-8.
79. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U. S. Rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:260-4.
80. Santillana E, Beceiro A, Bon G, Romero A. Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104(13):5354-9.
81. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippen A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2(8554):302-6.
82. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2005. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, 2006.

83. Goosens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended spectrum beta lactamase and Amp-C producing enterobacteriaceae from the MYSTIC program in Europe and United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 5:257-64.
84. Hackel M, Badal R, Bouchillon S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase production in Europe. In: Abstracts of the 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2008.
85. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistens amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997- 1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:183-9.
86. Livermore DM, Yuan M. Antibiotic resistance and production of extendedspectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:409-24.
87. Hanberger HJ, Garcia-Rodriguez A, Gobernado M, Goossens H, Nilsson IE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 6 European countries. French and Portuguese ICU Study Group. *JAMA* 1999; 281:67-71.
88. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000; 30:454-60.

89. Gunsere F, Mamikoglu I, Ozturk S, Yucesoy M, Biberoglu K, Yulug N i sur. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:373-8.
90. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1018-29.
91. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ i sur. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia- Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3280-4.
92. Goosens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended spectrum beta lactamase and AmpC-producing enterobacteriaceae from the MYSTIC program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:257-64.
93. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004; issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85.
94. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmidmediated AmpC beta lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:533-7.

95. Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3837-42.
96. Brett M. Extended spectrum b lactamases among urinary *E. coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand in 2000., N. Zealand: Institute of Environmental Science & Research, 2000.
97. Institute of Environmental Science and Research. ESBLs in enterobacteriaceae confirmed in 2005.g., New Zealand: ESR.
www.surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Antimicrobial/ESBL/ESBL_2005.pdf. (11 August 2009).
98. Briggs S, Ussher J, Taylor S. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae at Middlemore Hospital. *N Z Med J* 2005; 118:1563.
99. Heffernan H, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK. Prevalence and types of extended spectrum b lactamases among urinary *E. coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:544-9.
100. Paterson DL, Yu VI. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1419-22.
101. French GI, Shannon KP, Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam betalactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 1996; 34:358-63.

102. Gaillot O, Marucjous C, Abachin E, Lecuru F, Arlet G, Siomonet M, Berche P. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminate ultrasonography coupling gel. J Clin Microbiol 1998;1357-60.
103. Sirot D, Sirot J, Labia R i sur. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel B lactamase. J Antimicrob Chemother 1987; 20:323-34.
104. Bauernfeind A, Grimm H, Shweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection 1990; 18:294-8.
105. Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population based laboratory surveillance for *E. coli* producing ESBL: importance of community isolates with blaCTX-M genes. Clin Infect Dis 2004; 38:1736-41.
106. Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T i sur. Novel plasmid mediated beta lactamase from *E. coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:1243-6.
107. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended spectrum beta lactamase. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):33-41.
108. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidim hydrolysing extended spectrum beta lactamase CTX-M 15 and of its structurally related beta lactamase CTX-M3. J Antimicrob Chemother 2002; 50:1031-4.

109. Laupland KB, Church DL, Vidacovich J i sur. Community onset ESBL *E. coli* : importance of international travel. *J Infect* 2008; 57:441-8.
110. Rodriguez Bano J, Navarro MD. Extended spectrum beta lactamase in ambulatory care: a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1):104-10.
111. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(5):466-75.
112. Radice M, Power P, DiConza J, Gutking G. Early dissemination of CTX-M derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:602-3.
113. Zong Z, Petridge SR, Thomas L. Dominance of blaCTX-M within an Australian extended spectrum beta lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4198-202.
114. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. Collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:183-9.
115. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in β -lactamases an extended spectrum β lactamases. *BMJ* 2003; 327:1209-13.
116. Tuon FF, Bianchet LC, Pentead-Filho SR. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter* bacteremia in a brazilian hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:452-4.

117. Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-8.
118. Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, Vranes J. Predominance of SHV- β lactamase in enteric bacteria causing community-acquired urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13:820-3.
119. Dedic-Ljubovic A, Hukic M, Pfeifer Y, Witte W, Padilla E, López-Ramis I, Albertí S. Emergence of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:152-6.
120. Kenneth ST and Sanders CC. A simple and reliable method to screen isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for the production of TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3(5):549-554.
121. Bedenić B, Vraneš J, Bošnjak Z, Marijan T, Mlinarić-Džepina A, Kukovec T, Knežević J, Anušić M, Beader N, Barl P, Leskovar V, Kalenić S. Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum β -lactamase – producing *Klebsiella pneumoniae* strains in the community. *Med Glas Ljek komore Zenicko doboj kantona* 2010; 7:32-9.
122. Uzunovic–Kamberovic S, Saric D, Sestic S. Community – acquired urinary tract infections by extended – spectrum beta – lactamase – producing *Enterobacteriaceae* in Zenica – Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *Med Glas* 2006; 3:46-52.

123. Kassis-Chikhani N, Vimont S, Asselat K, Trivalle C, Minassian B, Sengelin C, Gautier V et al. CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1697-8.
124. Pitout JDD, Nordman P, Laupland KB and Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:52-9.
125. Ofner-Agostini M, Simor A, Mulvey M, McGeer A, Hirji Z, McCracken M, Gravel D, Boyd D. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP),¹ and Elizabeth Bryce. Risk factors for and outcomes associated with clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species resistant to extended-spectrum cephalosporins among patients admitted to Canadian hospitals. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009; 20(3):e43–e48.
126. Calbo E, Romaní V, Xercavins M, Gómez L, Vidal CG, Quintana S, Vila J, Garau J. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:780-3.
127. Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P and Prats G. Community Transmission of Extended-Spectrum β -Lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(8):1024-5.
128. Colodner R, Rock W, Chazan B, Keller N, Guy N, Sakran W, Raz R. Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:163-7.
129. Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, Hebden JN and Morris JG. Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum β -Lactamase–

Producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1144-9.

130. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended- spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8): 2061-7.
131. Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2(8554):302-6.
132. Shehabi AA, Mahafzah A, Baadran I, Qadar FA, Dajani N. High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum β -lactam drugs in intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36:53-6.
133. Lopez Cerrero L, Picon E, Morillo C i sur. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillintazobactam with extended spectrum beta lactamase producing and extended spectrum beta lactamase non producing *E. coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2):132-6.
134. Dechen CT, Shyamasree D, Adhiakari L, Pal R, Singh SKT. Extended Spectrum beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin. *J Glob Infect Di* 2009; 1(2):87-92.

135. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH, Visalli MA, Bradford PA. Determining incidence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:119-24.
136. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioterap* 2003; 16:233-8.
137. Bedenić B, Žagar Ž. Increased Beta-Lactamase Activity in *Branhamella Catarrhalis* after Exposure to Amoxicilin and Clavulanic Acid. *J Chemother* 1994; 6(6):383-7.
138. Smith CE, Tillman SB, Howel AW, Longfield RN, Jorgesen JH. Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agent Chemother* 1990; 34:1290-3.
139. Tuan FF, Briandref CL, Penteaob-F.lho S. R. Epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacter bacteremia in a Brazilian hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4):452-4.
140. Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, Abajo FJ and Spanish Members of EARSS. Increased Amoxicillin–Clavulanic Acid Resistance in *Escherichia coli* Blood Isolates, Spain. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(8):1259-62.

141. Knežević J, Jarža-Davila N, Anušić M, Mlinarić-Džepina A, Vraneš J. Karakteristike uzročnika urinarnih infekcija povezanih s kateterima u izvanbolničkoj populaciji. Med Glas 2010; 7(1).
142. Prohaska-Potočnik C i sur. Učestalost nalaza najčešćih uropatogena u djece... – Med Jad 2008; 38(1-2):5-11.
143. Tschudin-Sutter S, Frei R, Battagay M, Hoesli I and Widmer AF. Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* in Neonatal Care Unit. Emerg Infect Dis 2010; 16(11):1758-60.
144. Tandé D, Jallot N, Bougoudogo F, Montagnon T, Gouriou S and Sizun J. Extended-Spectrum β -Lactamase – Producing Enterobacteriaceae in Malian Orphanage. Emerg Infect Dis 2009; 15(3):472-4.
145. Tambič Andrašević A. Rezistencija na antibiotike najvažnijih bakterijskih patogena u dječjoj dobi. Paediatr Croat 2005; 49(1):198-201.
146. Lin CY, Huang SH, Chen TC, Lu PL, Lin WR, Chen JH. Risk factors of ciprofloxacin resistance in urinary *Escherichia Coli* isolates. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41:325-31.
147. Marijan T, Plečko V, Vraneš J, Mlinarić-Džepina A, Bedenić B, Kalenić S. Karakterizacija ESBL-producirajućih sojeva bakterija *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* izoliranih iz mokraće izvanbolničkih pacijenata zagrebačke regije. Med Glas 2010; 7(1).

148. Wu U, Yong CH, Chen W, Chen Y, Chang SH. Risk Factors for Bloodstream Infections due to Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. J. Microbiol Infect 2010; 43(4):310-6.
149. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide. 2nd ed. Geneva: WHO; 2002.
150. Winokur PL, Cauton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. Clin Infect Dis 2001; 32(2):594-103.
151. Yu Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum β -lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39:264-77.
152. Pai H. The characteristics of extended-spectrum β -lactamases on Korean isolates of Enterobacteriaceae. Yonsei Med J 1998; 39:514-9.
153. Chaikittisuk N, Munsrichoom A. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children at Queen Sirikit National Institute of Child Health. J Infect Dis Antimicrob Agents 2007; 24:107-15.
154. Rohman MM, Hag JA, Hossain MA, Sultana R, Islam F, Islam AH. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. Int J Antimicrob Agents 2004; 24:508-10.

155. Pattarachavi K, Apisarnthanorak A, Chanltat H, Piyawan S. Molecular characterisation and Epidemiology of Extended-Spectrum- β -lactamases Producing *E. coli* and *K. pneumoniae* Isolates Langing Health care - Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 2818-24.
156. Eisner A, Fogan JE, Feierl G, Kessles HH, Marth E, Livermore MD, Woodford N. Emergence of Enterobacteriaceae Isolates Producing CTX-M Extended-Spectrum β -lactamase in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2):785-7.
157. Badura A, Feierl G, Kessler HH, Grisold A, Masoud L, Wagner-Eibel U and Marth E. Multidrug-Resistant Bacteria in Southeastern Austria. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1256-7.
158. Husam SH, Bindayna MK, Senok CA, Botta AG. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(4):295-9.
159. Mokaddas EM, Abdulla AA, Shati S and Rotimi VO. The technical aspects and clinical significance of detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at a tertiary-care hospital in Kuwait. *J Chemother* 2008; 20:445-51.
160. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the United Arab Emirates. *Med Princ Pract* 2008; 17:32-6.

161. Reddy P, Malczynski M, Obias A, Reiner S, Jin N, Huang J, et al. Screening for extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among high-risk patients and rates of subsequent bacteraemia. *Clin Infect Dis* 2007; 45:846–52.
162. Šuljagić V, Mirović V. Osnovne epidemiološke karakteristike bolničkih infekcija krvi i njihovih uzročnika. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63(2):124–31.
163. Pitout CJDD, Gregson DB, Church DL and Laupland BK. Population-based Laboratory Surveillance for AmpC β -Lactamase-producing *Escherichia coli*, *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3):443-8.
164. Pournares S, Ikonomidis A, Sofianou D, Tsakris A and Maniatis AN. CTX-M-Type β -lactamases Affect Community *Escherichia coli* Treatment, Greece. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6):1163-4.
165. Kim MH, Lee HJ, Park KS, Suh JT. Molecular characteristics of extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of *qnr* extended spectrum β -lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J* 2010; 51:768–74.
166. Ruppé E, Hem S, Lath S, Gautier V, Arieu F, Sarthou JL, Monchy D and Arlet G. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(5):741-8.
167. Bedenić B, Vraneš J, Uzunović-Kamberović S, Žagar Ž. Uticaj urina na antimikrobnu osjetljivost kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* koji proizvode različite tipove β -laktamaza proširenog spektra. *Med Glas* 2007; 4(1): 1-7.

168. Sjölund-Karlsson M, Howie R, Krueger A, Rickert R, Pecic G, Lupoli K, Folster JP and Jean M. CTX-M-producing Non-Typhi *Salmonella* spp. Isolated from Humans, United States Whichard. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(1):97-9.
169. Sardelić S. Metalo β -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotika, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2010.
170. Nordmann P, Naas T and Poirel L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10):1791-8.
171. Andrašević S. Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na Antibiotike. *MEDICUS* 2006; 15(2):245–50.
172. Brdarić N, et. al. Novi antimikrobni lijekovi. *Croatian Journal of Infection* 2006; 26(3):109–26.
173. Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. *Indian J Med Res* 2009; 129:695-700.
174. Lee DS, Lee CB and Seung-Ju LSJ. Prevalence and risk factors for extended spectrum beta-lactamase-producing uropathogens in patients with urinary tract infection. *Korean J Urol* 2010; 51:492–7.
175. Rodriguez-Bano J, Navaro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Munian MA, Perea EJ, Perez-Cano R and Pascual A. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1089-94.

176. Sandoval C, Walter SD, McGeer A, Simor AE, Bradley SF, Moss LM and Loeb MB. Nursing Home Residents and *Enterobacteriaceae* Resistant to Third-Generation Cephalosporins. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6):1050-5.
177. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Counto E, Gutkind G, and the Microbiology Study Group, Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(9):2864-7.
178. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE i sur. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Available Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 42:657-68.
179. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended.spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(9):460-3.
180. Paterson DL, Ko WC, Von Gotterberg A i sur. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended spectrum beta lactamase. *Clin Infect Dis* 2004; 39:31-7.
181. Tambić-Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V and the Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:14-8.

182. Peterson LR. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: the role of piperacillintazobactam. Clin Microbiol Infect 2008; 14(4):181-4.
183. Lopez Cerrero L, Picon E, Morillo C i sur. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillintazobactam with extended spectrum beta lactamase producing and extended spectrum beta lactamase non producing *E. coli* isolates. Clin Microbiol Infect 2010; 16(2):132-6.
184. Thompson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam and the inoculum effect in tests with extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:3528-54.
185. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG i sur. Prevalence of ESBLs in South America. Clin Microbiol Infect 2008; 14(1):154-8.
186. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by enterobacteriaceae producing ESBLs. Clin Microbiol Infect 2000; 6:460-3.
187. Thomas M, Cartelle M, Pertega S i sur. Hospital outbreak caused by a carbapenem resistant strain of *Acinetobacter baumannii*; patient prognosis and risk factor for colonisation and infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11:540-6.
188. Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB, Mao X, Lautenbach E. Risk factor for increasing multidrug resistance among extended spectrum B lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. Clin Infect Dis 2005; 40:1317-24.

189. Urban C, Mariano NGE i sur. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*. J Infect Dis 1993; 167:448-51.
190. MacKenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SGB, Gould IM. Emergence of a carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1997; 350:783.
191. Subha A, Ananthan S. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. Indian J Med Microbiol, 2002; 20(2):92-5.
192. Whichard JM, Joyce K, Fey PD, Nelson JM, Angulo FJ and Barret TJ. β -Lactam Resistance and Enterobacteriaceae, United States. Emerg Infect Dis 2005; 11(9):1464-6.
193. Bedenić B, Bader N and Žagar Ž. Effect of inoculum size on the antibacterial activity of cefpirome and cefepime against *Klebsiella pneumoniae* strains producing SHV extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 2001; 7(11):626-35.
194. Bedenić B. Selection of *Klebsiella pneumoniae* Mutants with High-Level Cefotaxime Resistance during Growth in Serum Containing Therapeutic Concentrations of Cefotaxime. J Antimicrob Chemother 2002; 48:10-14.
195. Humaniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Klyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-ancoded CTX-M types. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3045-9.
196. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001; 48:59-64.

197. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in the members of the family Enterobacteriaceae-comparison of the double-disc and 3-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1877-82.
198. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10:867-78.
199. Sturenburg E, Sobottka I, Feucht HH, Mack D, Laufs R. Comparison of BDPhoenix and VITEK2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum beta-lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45(1),29-34.
200. 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.
201. Houvinen S, Houvinen P, Jacoby GA. Detection of plasmid-mediated β -lactamases with DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:175-9.
202. Arlet G, Brami G, Decrere D, Flippo A, Galtotot O, Lagrange PH, Philippon A. Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 135:1498-500.

203. Zali FH, Gascoyne-Binzi DM, Heritage J, Hawkey PM. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996; 37:797-802.
204. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Rahal J, Bush K. Imipenem (IPM) resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (K. pn). Caused by ACT-1, plasmid-mediated AmpC β -lactamase combined with loss an outer membrane porin protein. In: Program abstracts 36nd Interscience Conference on Antimicribial Agents and Chemotherapy. Washington: American Society for Microbiology 1996:39.
205. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4065-70.
206. Kelly MT, Brenner DJ, Farmer JJ. Enterobacteriaceae. U: Balows A, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, Murray PR, ur. Manual of clinical microbiology. Washington D.C.: ASM Prees 1995; 236-77.
207. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2002.
208. Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF. Development of a Multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherchia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9):4486-91.

209. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A and Arlet G. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol. Lett* 2002; 209:161-8.
210. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*VIM a new integron borne metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1584-90.
211. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3(2):117-27.
212. Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore D. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Ag* 2006; 27(4):351-3.
213. Kaufman ME. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Woodford N and Johnsons A, eds. *Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications*. 1st ed. New York: Humana Press Inc. Totowa 1998; 33-51.
214. Bishara J, Livne G, Ashkenazi S, Levy I, Pitlik S, Ofir O, Lev B, Samra Z. Antibacterial susceptibility of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Isr Med Assoc J* 2005; 7:298-301.

215. Yaman A, Tasova Y, Kibar F, Inal AS, Saltoglu N, Buyukcelik O, Kurtaran B, Dundar IH. Investigation of the antibiotic susceptibility patterns of pathogens causing nosocomial infections. *Saudi Med J* 2004; 25:1403-9.
216. Čabaravdić M, Šestić S, Uzunović-Kamberović S. Beta-laktamaze proširenog spektra djelovanja (ESBL) kod bolničkih gram-negativnih bakterijskih izolata. U: Zbornik apstrakata. Drugi kongres o kontroli bolničkih infekcija Bosne and Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Tuzla, B&H, 04. – 07. 11. 09. Udrženje mikrobiologa Bosne i Hercegovine, Tuzla, B&H, 2009; 74.
217. Andrašević S, Vranić-Ladavac M, Tambić-Andrašević A. Osjetljivost enterobakterija na antibiotike *Croatian J Infect* 2009; 29(4):171–6.
218. Dharmishtha TG, Paragi GJ, Kiran PN. A study on antibiotic related resistance in UTI patients: a comparison between community acquired and hospital acquired *E. coli*. *National Journal of Community Medicine* 2012; 3(2):255-8.
219. Bequero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13(47):20.
220. Rudresh SM and Nagarathnamma T. Extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* & antibiotic co-resistance. *Indian J Med Res* 2011; 133(1):116–8.
221. Okesola AO, Oni AA. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* in a tertiary care hospital in South West Nigeria. *Int J Pharm Biomed Sci* 2012; 3(4),148-51.

222. Akram M, Shahid M and Asad U. Khan <http://www.ann-clinmicrob.com/content/6/1/4/> -
ins1 Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract
infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 6:4.
223. Čulig J, Mlinarić-Džepina A, Leppee M, Vraneš J. Rezistencija uropatogenih sojeva
bakterije *Escherichia coli* kod trudnica i žena generativne dobi u usporedbi s potrošnjom
antibiotika u Zagrebu. *Med Glas* 2010; 7(1).
224. Caswell MW, Phillips I. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and
epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med* 1981; 70:459-62.
225. Sotto A, de Boever CM, Fabbro-Peray P, Gouby A, Sirot D, Jourdan J. Risk factors for
antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract
infections: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2001; 39:438-44.
226. OK, Ergonul O, Timurkaynak F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among
Escherichia coli strains isolated from community-acquired urinary tract infections in
Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:914-8.
227. Lefton-Guibout V, Speldooren V, Heym B and Nicolas-Chanoine MH. Epidemiological
survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in
Escherichia coli isolates in France: new genetic features of blaTEM genes. *Antimicrob
Agents Chemother* 2000; 44:2709-14.
228. Hooton TM, Levy SB. Antimicrobial resistance: a plan of action for community practice.
Am Fam Physician 2001; 63:1034-39.

229. Hutchinson JM, Foley RN. Method of physician remuneration and rates of antibiotic prescription. *Can Med Assoc J* 1999; 160:1013–7.
230. Medawar C. *The wrong kind of medicine?* Consumers Association and Hodder & Stoughton, London, 1994.
231. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL and Laupland KB. Population-based Laboratory Surveillance for AmpC β -Lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3):443-8.
232. Correa LL, Botelho LAB, Barbosa LC, Mattos CS, Carballido JM, De Castro CLT, Mondino PJJ, De Paula GR, De Mondiol SSB, De Mendoca-Souzal CRV. Detection of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. *Braz J of Infec Dis* 2012; 16(6).
233. Albertini MT, Benoit C, Berardi L, Berrouane Y, Boisivon A, Cahen P i sur. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J Hosp Infect* 2002; 52:107-13.
234. Sekowska A, Janicka G, Klyszejko C, Wojda M, Wroblewski M, Saymankiewicz M. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Med Sci Monit* 2002; 8:100-4.

235. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, Lontie M, Meensel BV, Herman L, Haesebrouck F and Butaye P. Characterization of Extended- Spectrum β -Lactamases Produced by *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized and Nonhospitalized Patients: Emergence of CTX-M-15-Producing Strains Causing Urinary Tract Infections. *Microbial Drug Resistance* 2010; 16(2):129-34.
236. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(5):459-69.
237. Cavaco LM, Abatih F, Aarestrup FM and Guardabassi L. Selection and Persistence of CTX-M producing *Esch. coli* in the intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin, Ceftiofur or Cefquinome, *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10):3612-6.
238. Ensor VM, Shahid M, Evans JT and Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals, *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:1260-3.
239. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe, *Eurosurveillance* 2008; 13(47).
240. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; 14(9):413-20.
241. Ye QH, Lau Y, Liang B, Tian SF. Antimicrobial resistance, genotypic characterization and pulsed-field gel electrophoresis typing of extended spectrum β -lactamases-producing clinical *Escherichia coli* strains in Macao, China. *Chin Med J* 2011; 124(17):2701-7.

242. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL, Elsayed S and Laupland KB. Community wide outbreaks of Clonally Related CTX-M-14 β -lactamase-producing *Escherichia coli* Strains in the Calgary health region. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6):2844-9.
243. Livrelli V, Champs CD, Martino PD, Michaud AD, Forestier C, Joly B. Adhesive Properties and Antibiotic Resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* Clinical Isolates Involved in Nosocomial Infections. *J Clin Microbiol* 1996; 34(8):1963-9.
244. Taslima Y. Prevalence of ESBL among *Esch. coli* and *Klebsiella* spp. in a tertiary care hospital and molecular detection of important ESBL producing genes by multiplex PCR. Dissertation 2012.
245. Singh RKM, Pal NK, Banerjee M, Sarkar S, SenGupta M. Surveillance on Extended Spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase producing gram negative isolates from nosocomial infections. *Arch Clin Microbiol* 2012; 3(3):1-7.
246. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL and Laupland KB. Population-based Laboratory Surveillance for AmpC β -Lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3):443-8.
247. Reuland EA, Halaby T, Hays JP, De Jongh DMC, Snetselaar HDR, Elders PJM, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Naiemi N. Prevalence of community-acquired plasmid-mediated AmpC in The Netherlands. ECCMID, poster session P1223.
248. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161-82.

249. Black JA, Thomson KS, Buynak JD and Pitout JD. Evaluation of β -lactamase inhibitors in disc tests for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in well characterized clinical strains of *Klebsiella spp.* J Clin Microbiol 2005; 43:4161-71.
250. Tonkić M. Molekularna karakterizacija sojeva *Escherichia coli* koji luče β -laktamaze proširenog spektra izoliranih u dječijoj i odrasloj populaciji. Doktorska disertacija, 2006.
251. Meglič KM, Koren S, Palepou MFI, Karisik E, Livermore DM, Andlovic A, Jeverica S, Križan-Hergouth V, Muller-Premru M, Seme K, Slovenian Study Group, Woodford N. Epidemiology of Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M beta-lactamases in Slovenia. ECCMID 2013, poster presentation (P676).
252. Gulamber C, Altindis M, Kalayci R, Bozdogan B and Aktepe OC. Molecular characterization of nosocomial CTX-M type β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* from University Hospital in Turkey. African J Microbiol Res 2012; 6(27):5552-7.
253. Pagani L, Dell Amico E, Migliavacca R, Andrea MMD, Giacobone E, Amicosante G et al. Multiple CTX-M type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. J Clin Microbiol 2003; 41:4264-9.
254. Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E, Milch H, Kozlova N, Sidorenko S, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. J Clin Microbiol 1999; 37:3774-7.
255. Doucet-Populaire F, Bonnet R, Ghnassia JC, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3 producing *Enterobacter cloacae* in France. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:3239-40.

256. Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R, Kinoshita R, Aihara M. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:631-8.
257. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4320-5.
258. Mavroidi A, Tzelepi E, Miriagou V, Gianneli D, Legakis NJ, Tzouveleki LS. CTX-M-3 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Greece. *Microb Drug Resist* 2002; 8:35-7.
259. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quinn JP. Clinical isolates of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. Prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:790-3.
260. Winstanely TG, Ridgway EJ, Parys BT, Woodford N, Ward E, Livermore DM. First isolation of CTX-M-3 producer in the United Kingdom. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:625-7.
261. Lopes ACS, Veras DL, Lima AMS, Melo RCA, Ayala J. *Bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mern Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(2):163-7.

262. Kingsley J, Verghese S. Sequence analysis of blaCTX-M-28, an ESBL responsible for third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae*, for the first time in India. *Indian J Pathol Microbiol* 2008; 51(2):218-21.
263. Li Y, Li Q, Yiang X, Tang J, Wang J, Li G, Jiang Y. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2 Type AmpC beta-lactamase resistance in China. *J Clin Microbiol* 2008, 46(4):1317-21.
264. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognising the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:59-64.
265. Matinez P, Garzon D, Mattar S. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16(5):420-5.
266. Fraser LS. *Enterobacter* Infections. eMedicine. 2007.
www.emedicine.com/med/topic678.htm
267. Crowley B and Ratcliffe G. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae*: underestimated but clinically significant! *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1316-7.
268. Stuart JC, Diederer B, Naiemi N, Fluit A, Arents N, Thijsen S, Vlaminckx B, Mouton JW and Hall ML. Method for Phenotypic Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Enterobacter* Species in the Routine Clinical Setting. *J Clin Microbiol* 2011; 2711-3.

269. Towne TG, Lewis JS, Herrera M, Wickers B and Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacter* isolates. J Clin Microbiol 2010; 298-9.
270. Dai W, Sun S, Yang P, Huang S, Zhang X, Zhang L. Characterization of carbapenemases, extended-spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. Infect Genet Evol 2013; 14:1-7.
271. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Hirotsu A, Arai K, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Kaku M. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in *Enterobacter* species from Japan. PloS One 2012; 7(6):e37967.
272. Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med Mal Infect 2012; 42(1):20-9.
273. Bedenic B, Goic-Barisic I, Budimir A, Tonkic M, Mihajkevic LJ, Novak A, Sviben M, Plecko V, Punda-Polic V, Kalenic S. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of selected gram-negative bacilli from two Croatian hospitals: MYSTIC study results. J. Chemother 2010; 22(3):147-52.
274. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(8):2700-6.

275. Carattoli A, Garcia-Fernandez A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *Clin Microbiol* 2008; 46(1):103-8.
276. Caccamo M, Perilli M, Celenza G, Bonfiglio G, Tempera G, Amicosante G. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among isolates of *Enterobacteriaceae* from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist* 2006; 12(4):257-64.
277. Arpin C, Coulange L, Dubois V, Andre C, Fischer I, Fourmaux S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9):3440-4.
278. Alabi S, Mendoca N, Adeleke O, Da Silva G. Antimicrobial resistance and prevalence of extended- spectrum beta-lactamase *Proteus* spp. strains from southwestern Nigeria hospitals. ECCMID 2013 poster presentation.
279. Tonkic M, Mohar B, Sisko-Kraljevic K, Mesko-Meglic K, Goic-Barisic I, Novak A, Kovacic A, Punda-Polic V. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains in southern Croatia. *J Med Microbiol* 2010; 59(10):1185-90.
280. Nakano R, Nakano A, Abe M, Inoue M, Okamoto R. Regional outbreak of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *J Med Microbiol* 2012; 61(12):1727-35.

281. Wu JJ, Chen HM, Ko WC, Wu HM, Tsai SH, Yan JJ. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005: identification of a novel CTX-M enzyme (CTX-M-66). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008, 60(2):169-75.
282. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W and Thomson KS. Prevalence of Newer β -Lactamases in Gram-Negative Clinical Isolates Collected in the United States from 2001 to 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 3318-24.
283. Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(6):1370-4.
284. Novais A, Canton R, Machado E, Curiao T, Baquero F, Perixe L, Coque TM. International dissemination of a multi-resistant IncA/C2 plasmid containing blaTEM-24, Tn21 and Tn1696 among epidemic and non-epidemic *Enterobacteriaceae* species. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Barcelona, 2008.
285. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, et al. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 56(4):1238-43.

286. Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R, Mantengoli E, Hujer AM, Hujer KM, Pagani L, Bonomo RA, Rossolini GM and Toniolo A. Spread in an Italian Hospital of a Clonal *Acinetobacter baumannii* Strain Producing the TEM-92 Extended-Spectrum β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(6):2211-4.
287. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, and Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:172-82.
288. Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C and Nordmann P. Extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolates from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:157-8.
289. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, and Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamase among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2265-9.
290. Yong D, Shin JH, Kim S, Lim Y, Jum JH, Lee K, Chong Y, and Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1749-51.
291. Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, Faccione D, Corso A, and Galas M. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in a Americas. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3222-4.

292. Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon JL, Nordmann P, and Astagneau P. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase in a hospital setting. *J Hosp Infect* 2005; 60:14-18.
293. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, and Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3542-7.
294. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, and Wu J. Study on the molecular epidemiology of SHV type β -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2004; 25:425-7.
295. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, and Perilli M. Spread of *bla*_{CTX-M-type} and *bla*_{PRE-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:975-8.
296. Nagano N, Nagano Y, Cordevant C, Shibata N, and Arakawa Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3978-84.
297. Shakil S, Khan AU. Detection of CTX-M-15-producing and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from urine from an Indian hospital. *J Chemother* 2010; 22(5):324-7.
298. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:321-31.

299. Donald HM, Scaife W, Amyes SGB, Young H. Sequence analysis of ARI-1 a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:196-9.
300. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1556-61.
301. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27 molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:583-8.
302. Karah N. Identification, molecular epidemiology and antibiotic resistance characterization of *Acinetobacter* spp. clinical isolates. Doctoral dissertation 2011.
303. Feizabadi MM, Fathollahzadeh B, Taherikalani M, Rasoolinejad M, Sadeqhifard N, Aligholi M, Soroush S, Mohammadi-Yegane S. Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of blaOXA genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. *Jpn J Infect* 2008; 61(4):274-8.
304. Correa LL, Botelho LAB, Barbosa LC, Mattos CS, Carballido JM, De Castro CLT, Mondino PJJ, De Paula GR, De Mondiol SSB, De Mendoca-Souzal CRV. Detection of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. *Braz J of Infec Dis* 2012; 16(6).

305. Lee K, Kim MN, Choi TY, Cho SE, Lee S, Whang DH, Yong D, Chong Y, Woodford N, Livermore DM, the KONSAR Group 1. Wide dissemination of OXA-type carbapenems in clinical *Acinetobacter* spp. isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(6):520-4.
306. Franolic-Kukina I, Bedenic B, Budimir A, Herljević Z, Vranes J, Higgins PG. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-72 positive *Acinetobacter baumannii* in a Croatian university hospital. *Int J Inf Diseases* 2011; 15(10);e706-709.
307. Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian GB, Marschall J, Urban CM, Spellberg BJ, Rhee D, Halstead DC, Pa sculle AWand Doi Y. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol* 2011; 49(11):3849-54.

9. SAŽETAK

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) su enzimi otkriveni u kasnim 1970-tim i ranim 1980-tim godinama među gram-negativnim bakterijama, prvenstveno kod izolata *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Češće se pojavljuju među bakterijskim vrstama koje posjeduju inducibilne AmpC beta-laktamaze. Plazmidne beta-laktamaze za razliku od kromosomskih nisu karakteristične za vrstu i uzrok su širenja bakterijske otpornosti.

Do sada nije bilo sistematskih istraživanja ESBL kako na području Zeničko-Dobojskog kantona, tako i na području Bosne i Hercegovine.

Cilj istraživanja je ustanoviti prevalenciju ESBL u bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, prevalenciju prema dobi i spolu, te prevalenciju ESBL, plazmidnih AmpC beta-laktamaza, te karbapenemaza na pojedinim bolničkim odjelima na području Zeničko-Dobojskog kantona, Bosna i Hercegovina (BiH).

Izolati su sakupljeni u periodu od Prosinca 2009. do Travnja 2010. godine. Izolovani su iz različitih uzoraka, kao što su mokraćna, sputum, rane, gnoj, aspirat i sl. Antimikrobna osjetljivost je analizirana disk-difuzijskom i bujon mikrodilucijskom metodom. Za dokazivanje produkcije ESBL, koristili smo dvostruki-disk sinergijski test uz upotrebu cefpodoksima i kombinacije diskova antibiotika sa klavulanskom kiselinom. Od molekularnih metoda za tipizaciju i klonsku pripadnost ESBL-producirajućih izolata korištena je PCR i PFGE metoda.

ESBL-producirajući izolati su izolovani u 144 bolnička i izvanbolnička uzorka. ESBL-producirajući izolati su većim dijelom porijekla iz mokraćne i briseva kirurških rana. U bolničkoj sredini dominantna je ESBL-producirajuća *Klebsiella* spp., dok je u izvanbolničkoj sredini preovladavala ESBL-producirajuća *E. coli*. Prema rezultatima, cefuroksim, cefotaksim i ceftazidim su lijekovi koji se ne bi smjeli koristiti u terapiji infekcija ESBL-producirajućih izolata,

sa $\text{MIK}_{90} \geq 256$ mg/L. U bolničkoj i izvanbolničkoj sredini, među ESBL tipovima, CTX-M-15 beta-laktamaza je najzastupljenija. Ovo je prva studija i izvještaj o detekciji *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-28}, *bla*_{CMY-2} i *bla*_{DHA-1} na prostorima Bosne i Hercegovine. Metodom PFGE nije ustanovljena klonska srodnost među ESBL-producirajućim izolatima. Zbog visoke rezistencije na cefalosporine, glikozide i fluorokinolone, karbapenemi su lijekovi prve linije u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim izolatima.

10. SUMMARY

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are enzymes that have been discovered in the late 1970s and early 1980s among gram-negative bacteria, primarily with strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. They show up more commonly among bacteria species possessing inducible AmpC beta-lactamases. Plasmid mediated beta-lactamases, unlike chromosomes type, are not characteristic for the specie and are the cause of the spread of bacterial resistance.

So far, there has been no systematic research of ESBL in the area of Zenica-Doboj Canton as well as in the area of Bosnia and Herzegovina.

The aim of this research is to establish prevalence of ESBL in hospital and outside environment, prevalence according to the age and sex, as well as prevalence of ESBL in individual hospital wards. It also includes prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and carbapenemases in the area of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina.

Non-duplicate isolates collected from December 2009 to May 2010. The isolates were obtained from urine, sputum, wound and others (pus, aspirates etc). Antimicrobial susceptibility of the isolates was determined using Kirby-Bauer disc diffusion method and broth microdilution method. ESBL phenotypes were determined by the double disc synergy method using cefpodoxime with co-amoxiclav, and then confirmed by the combined disc method. The ESBL genotypes, *bla*TEM, *bla*CTX-M and *bla*SHV were determined using PCR and PFGE.

ESBL was detected in 144 in- and outpatient samples, respectively. Both in- and outpatient ESBLs were mostly isolated from urine and surgical wounds. ESBL prevalence was highest in an inpatient *Klebsiella* spp. and in outpatient *Escherichia coli* isolates. Cefuroxime, ceftazidime and cefotaxime were the least potent antibiotics with MIC₉₀ of ≥ 256 mg/L. The CTX-M-15 was most prevalent β -lactamases in the in- and outpatient settings. This is the first study and report of

*bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-28}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{DHA-1} detected with the PCR from ESBL-producing isolates in Bosnia and Herzegovina. PFGE showed no genetic relatedness between the isolates. Due to high resistance rates observed for all cephalosporins, glycosides and fluoroquinolones, carbapenems remain the antibiotics of choice for the treatment of infections caused by ESBLs.

11. PREGLED KORIŠTENIH SIMBOLA I OZNAKA

ATCC	American type Culture Collection
AMX	amoksicilin
AMC	amoksiclin+klavulanska kiselina
AM	amikacin
bla	gen koji kodira beta-laktamaze
CDC	engl., Centers for Disease Control and Prevention
CTX-1	cefotaksimaza
CLSI	engl., Clinical Laboratory Standard Institute
CN	cefaleksin
CXM	cefuroksim
CIP	ciprofloxacilin
CRO	ceftriakson
CAZ	ceftazidim
CFM	cefiksim
CTX	cefotaksim
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DDS	duble disc synergy test/dvostruki disk –sinergistički test
ESBL	engl., extended-spectrum beta-lactamase
ESC	engl. extended-spectrum cephalosporins
EARSS	engl., European Resistance Surveillance System
FEP	cefepim
F/M	nitrofurantoin
GEN	gentamicin
IRT	engl., inhibitor-resistant TEM

ICU	engl., intensive care unit
IMIP	imipenem
IMS	infekcije mokraćnog sistema
JINJ	jedinica intenzivne njege
LVX	loracarbef
MBL	Metalo beta-laktamaze
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MDR	engl., multidrug resistnce
NOR	norfloksacin
PBP	engl., protein binding protein
PCR	polymerase chain reaction/lančana reakcija polimeraze
SXT	sulfometoksazol-trimetoprim
SHV	sulfhydryl variable-1 beta-laktamaza
TEM-1	tip beta laktamaze nazvan po početnim slovima imena Temoniera
TET	tetraciklin
VIM	Veronska imipenemaza

12. BIOGRAFIJA

Amir (Avdulah i Selma) Ibrahimagić, rođen 12. 04. 1982. godine u Zenici, neoženjen. Završio osnovnu školu Manojlo Popić (današnja Meša Selimović) i srednju Medicinsku školu u Zenici. Svoje obrazovanje nastavio je u Sarajevu na Fakultetu zdravstvenih studija i stekao zvanje diplomirani inženjer medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Nakon završenog fakulteta, upisao Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti u Osijeku (Hrvatska),

2006. godine zasnovao radni odnos u JU. Kantonalnoj bolnici Zenica, na Službi za mikrobiologiju, a 2010. godine prešao u JU. Kantonalni zavod za javno zdravstvo Ze-Do kantona (Služba za sanitarnu i kliničku mikrobiologiju), radi naučnog i stručnog usavršavanja. Ujedno od 2010. godine, aktivno je uključen u naučno obrazovanje mladih, te radi kao stručni saradnik/asistent na Sveučilištu/Univezitetu „VITEZ“ Vitez i na Zdravstvenom fakultetu u Zenici od 2012. godine. Radio kao predavač praktične nastave u Srednjoj medicinskoj školi na stručnim predmetima, u periodu od 2011-2013. godine.

Pored formalnog obrazovanja, aktivno se bavi i neformalnim tipom, kao aktivni član odbojkaškog kluba RUKI Zenica, Bowling kluba Zenica i Saveza izviđača općine Zenica (načelnik štaba Saveza izviđača općine Zenica, 2004-2010).

KONGRESNI SAŽECI:

1. **Ibrahimagić A.** Frequency of occurrence of viral hepatitis in the Zenica region. Symposium with international participation – HIV/AIDS and HEPATITIS, prevention, discovering and treatment. Osijek, Croatia, 2007, 30 pages (lecturer).
2. Uzunović-Kamberović S, **Ibrahimagić A**, Bedenić B. Karakteristike *E.coli/non-Escherichia coli* uzročnika infekcija mokraćnog sistema u pacijenata liječenih ambulantno u Zeničko-dobojskom kantonu: prevalencija, ESBL produkcija i antimikrobna rezistencija. U: Knjiga sažetaka. 2. Hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, 14. – 16. 05. 2010. Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a, Klinika za infektivne bolesti “Dr Fran Mihaljević” Zagreb, Hrvatska, Zagreb 2010.
3. Uzunovic-Kamberovic S , Bedenic B, **Ibrahimagic A**, Kamberovic F, Ille T, Sivec S, Zagar Z. The first investigation of prevalence and molecular epidemiology of infections caused by beta-lactamase producing Gram-negative bacteria in hospital and community settings in Bosnia and Herzegovina. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)/27st International Congress of Chemotherapy (ICC), Milan/Italy, May 7-10, 2011. Poster No 553. Clin Microbiol Infect 2011; 17 (Suppl. s4): S108.
4. Uzunovic-Kamberovic S, Rijnders I.A.M, Stobberingh E.E, **Ibrahimagic A**, Kamberovic F, Dizdarevic J, Ille T, Tandir S. Molecular characterization of clinical (inpatients/outpatients) and colonizing methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bosnia and Herzegovina. The 4th Eurasia Congress of

- Infectious Diseases, Sarajevo/B&H, June 01-05, 2011. U: Karahasan A, Gunaydin M, Ahmetagić S, Tihic N, Hosoglu S, Leblebicioglu, eds. Abstract book. Bilimsel Tip Yayınevi, Ankara, 2011. Abstract No 061, str.175.
5. Uzunovic-Kamberovic S, Rijnders I.A.M, Stobberingh E.E, **Ibrahimagic A**, Kamberovic F, Ille T. Population structure of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy food handlers in Bosnia and Herzegovina. 4th Congress of European Microbiologists, FEMS, Geneva/Switzerland, June 26-30, 2011. Abstracts No 1825. (USB online).
 6. Uzunović-Kamberovic S, Bedenic B, **Ibrahimagic A**, Kamberovic F, Ille T, Sivec S, Zagar Z. Molecular epidemiology of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacteria in Bosnia and Herzegovina. 4th Congress of European Microbiologists, FEMS, Geneva/Switzerland, June 26-30, 2011. Abstracts, No 401. (USB online).
 7. Uzunovic-Kamberovic S, Bedenic B, **Ibrahimagic A**, Kamberovic F. Characterisation of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase in *Klebsiella* spp. from urinary tract infections in hospital and community settings in Bosnia and Herzegovina. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), London, United Kingdom, 31 March – 3 April 2012. Poster No 1873. Clin Microbiol Infect 2012; 18 (Suppl. s3): 532-533.
 8. Uzunović S, **Ibrahimagić A**, Kamberović F, Kunarac M, Rijnders M. I. A, Stobberingh E. Inducible clindamycin resistance in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of inpatient, outpatient and healthy carriers. International Meeting

on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna, Austria, February 15-18, 2013. Abstract book Poster No 21.012.

9. **Ibrahimagic A**, Bedenic B, Kamberovic F, Uzunović S, Sivec S. High prevalence of blaCTX-M-15; first report of blaCTX-M-28, blaCTX-M-3, blaCMY, blaDHA and blaFOX producing Enterobacteriaceae causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings. 23 nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 27 – 30 April 2013. Clin Microbiol Infect 2013. Supplement (e). Poster No 1231
[http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=2&search_term=&entrytype\[\]=17&entrytitle\[\]=4534](http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=2&search_term=&entrytype[]=17&entrytitle[]=4534)
10. Kamberović F, **Ibrahimagić A**, Uzunović S, Budimir A, Rijnders I. A. M, Stobberingh E. E. High prevalence of low-level methicillin-resistance in clinical mecA-positive Staphylococcus aureus isolates in Bosnia and Herzegovina. 23 nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 27 – 30 April 2013. Clin Microbiol Infect 2013. Supplement (e) Poster No 1955
[http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=2&search_term=&entrytype\[\]=17&entrytitle\[\]=4534](http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=2&search_term=&entrytype[]=17&entrytitle[]=4534)
11. Uzunovic S, Bedenic B, Budimir A, Kamberovic F, **Ibrahimagic A**, Delic-Bikic S, Rijnders M, Stobberingh E, Sivec S, Mestrovic T. Emergency (clonal spread) of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria infections at a paediatric department. 23 nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 27 – 30 April

2013. Clin Microbiol Infect 2013. Supplement (e). Abstract (publication only); R 2933 ([http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=3&search_term=&entrytype\[\]=19&entrytitle\[\]=4948](http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=3&search_term=&entrytype[]=19&entrytitle[]=4948))
12. Uzunović S, Bedenic B, Budimir A, Kamberovic F, **Ibrahimagic A**, Rijnders I. A. M, Stobberingh E. E, Fiolić Z. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmid-mediated AmpC-producing Gram-negative bacteria associated with skin and soft tissue infections in hospital and community settings. 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, Clinical Microbiology Infectious Diseases Immunology and Epidemiology, 15 – 18 May 2013, Tirana, Albania. U: Karahasan A, Gunaydin M, Pipero P, Harxhi A, Koraqi A, Puca E, Hosoglu S, Leblebicioglu H, eds. Abstract book. Bilimsel Tip Yayınevi, Ankara, 2013. Abstract No 011, str.134.
13. **Ibrahimagic A**, Kamberovic F, Bedenic B, Uzunović S. Molecular characteristics and antibiotic resistance of *Acinetobacter* species; predominance of blaOXA-51 and blaVIM, isolated from patients in Bosnia and Herzegovina. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), Leipzig, Germany/July 21 – 25, 2013. Abstracts No 514.

PUBLIKACIJE:

1. Selma Uzunović-Kamberović, Michelle I. A. Rijnders, Ellen E. Stobberingh, **Amir Ibrahimagić**, Farah Kamberović and Tatjana Ille. **Molecular characterization of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients and outpatients in Bosnia and Herzegovina.** Wiener Medizinische Wochenschrift: Volume 163, Issue 1 (2013), page 13-20

2. Selma Uzunović, **Amir Ibrahimagić**, Farah Kamberović, Michelle I. A. Rijnders and Ellen E. Stobberingh. **Molecular Characterization of Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Food Handlers Bosnia and Herzegovina.** The Open Infectious Diseases Journal, 2013, 7, 15–20.
3. Selma Uzunović, **Amir Ibrahimagić**, Farah Kamberović, Manja Kunarac, Michelle I. A. Rijnders, Ellen E. Stobberingh. **Inducible clindamycin resistance in methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus of inpatient, outpatient and healthy carriers in Bosnia and Herzegovina.** Med Glas (Zenica) 2013; 10 (2): 217-224.

NAUČNI PROJEKTI:

2009. – 2010.

Federal Ministry of Education and Science (No. 03-39-5980-58-1/08):

“Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing gram-negative bacteria caused wound infections in surgical ward”. Project leader: Ass. prof. Selma Uzunović-Kamberović; members of project team: Ass. Prof. Tandir Salih (Zenica, B&H), Ibrahim Cero, MD. (Zenica, B&H), Šabanović Fadil, MD (Zenica, B&H), Stobberingh Ellen, PhD (Maastricht, Netherlands), Ass. prof. Bedenić Branka (Zagreb, Croatia), Prof. Ilie Tatjana (Beograd, Serbia), Dizdarević Jasmin, MD (Zenica, B&H), **Amir Ibrahimagić**, Master of Laboratory Medical Engineering (Zenica, B&H).