

# Antimikrobna rezistencija izolata bakterija Enterobacteriaceae iz ljudskog urogenitalnog sustava

---

Jurišić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:489556>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Jurišić

**Antimikrobna rezistencija izolata bakterija  
*Enterobacteriaceae* izdvojenih iz ljudskog  
urogenitalnog sustava**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Matea Jurišić

**Antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae*  
isolates recovered from human urogenital  
system**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju, Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Hrenović na pomoći tijekom pisanja diplomskog rada. Također sam neizmjerljivo zahvalna cijelom timu kao i voditeljici Odjela za urogenitalne infekcije na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, dr. sc. Blaženki Hunjak, prim. dr. med. što mi je ustupila izolate porodice *Enterobacteriaceae* za potrebe izrade diplomskog rada.

Posebnu zahvalnost želim uputiti mom dragom mužu koji je neumorno stajao uz mene, pružajući mi podršku i razumijevanje kroz sve izazove koje studiranje nosi sa sobom. Njegova nepokolebljiva vjera u mene bila je moj oslonac kroz mnoge teške trenutke i motivacija da uvijek idem dalje. Također, ne mogu ne izraziti duboku zahvalnost cijeloj mojoj obitelji. Njihova nesebična podrška, trud i žrtva omogućili su mi da se usredotočim na svoje obrazovne ciljeve i uspješno ih ostvarim. Svaka žrtva, svaki sat proveden pružajući mi pomoć, i svaki trenutak ohrabrenja igrali su ključnu ulogu u mojem putu. Hvala vam što ste bili moj temelj, moj vjetar u leđa i moj najveći izvor inspiracije.

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Antimikrobna rezistencija izolata bakterija *Enterobacteriaceae* izdvojenih iz ljudskog urogenitalnog sustava**

**Matea Jurišić**

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Antibiotici su farmakološke tvari koje zaustavljaju umnažanje bakterija, a da pri tome ne uzrokuju značajnu štetu domaćinu. Danas je rezistencija bakterija na antibiotike vrlo raširena, a razvila se ponajviše zbog neracionalne upotrebe antibiotika. Posebnu zabrinutost predstavlja sve češća pojava multiplorezistentnih izolata koji produciraju  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL). *Enterobacteriaceae* su heterogena skupina bakterija i česti su uzročnici infekcija mokraćnog, spolnog i probavnog sustava. Cilj istraživanja bio je pružiti uvid u antimikrobnu rezistenciju izolata bakterija *Enterobacteriaceae* u Hrvatskoj te utvrditi prevalenciju ESBL producirajućih izolata. Izolati bakterija *Enterobacteriaceae* su izdvojeni iz ljudskog urogenitalnog sustava od strane djelatnika Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i ustupljeni su za provedbu eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Osjetljivost izolata na antibiotike ispitana je disk-difuzijskom metodom po Kirby-Baueru i metodom dvostrukog disk-sinerijskog testa. Utvrđena je velika rezistencija *Enterobacteriaceae* na  $\beta$ -laktame (ampicilin 100%, svi cefalosporini više od 90%), fluorokinolone (ciprofloksacin 77%, norfloksacin 74%) i aminoglikozide (gentamicin 44% i amikacin 10%). Samo 10% izolata *Enterobacteriaceae* produciralo je ESBL.

Ključne riječi: bakterije,  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra, rezistencija, antibiotici, urogenitalne infekcije (64 stranica, 9 slika, 5 tablica, 86 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Rad prihvaćen: 7.9.2023.

---

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

### **Antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* isolates recovered from human urogenital system.**

Matea Jurišić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Antibiotics are pharmacological substances that inhibit the multiplication of bacteria without causing significant harm to the host. Today, bacterial resistance to antibiotics is widespread and has mainly developed due to the irrational use of antibiotics. A particular concern is the increasingly frequent occurrence of multi-drug resistant isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). *Enterobacteriaceae* are a heterogeneous group of bacteria and are common causes of urinary, sexual, and digestive system infections. The aim of the research was to provide insight into the antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* isolates in Croatia and to determine the prevalence of ESBL-producing isolates. *Enterobacteriaceae* bacterial isolates were obtained from the human urogenital system by the staff of the Croatian Institute of Public Health and were provided to me for the experimental part of my thesis. The sensitivity of the isolates to antibiotics was tested using the Kirby-Bauer disk diffusion method and the double disk synergy test. A high resistance of *Enterobacteriaceae* to  $\beta$ -lactams (ampicillin 100%, all cephalosporins over 90%), fluoroquinolones (ciprofloxacin 77%, norfloxacin 74%) and aminoglycosides (gentamicin 44% and amikacin 10%) was determined. Only 10% of *Enterobacteriaceae* isolates produced ESBL.

Keywords: bacteria, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, resistance, antibiotics, urogenital infections  
(64 pages, 9 figures, 5 tables, 86 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Jasna Hrenović, PhD

Reviewers:

Prof. Jasna Hrenović, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Assoc. Prof. Petar Kružić, PhD

Thesis accepted: 7.9.2023.

# KRATICE

AMR (eng. Antimicrobial Resistance)-antimikrobna rezistencija

MIK (eng. Minimum Inhibitory Concentration)-minimalna inhibitorna koncentracija

MDR (eng. multidrug resistant)-multiplorezistentne bakterije

PBP (eng. penicillin binding protein)-proteini koji vežu peniciline

IMS- infekcije mokraćnog sustava

ESBL (eng. extended spectrum  $\beta$ -lactamases)- $\beta$ -laktamaze proširenog spektra

EUCAST (eng. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)- Europski odbor za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

MH- Muller-Hinton agar

DDST (eng. Double Disc Synergy Test)-dvostruki sinergijski test



## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 UVOD U ANTIBIOTIKE .....	2
1.1.1 Povijest antibiotika .....	3
1.2 PODJELA ANTIBIOTIKA.....	6
1.2.1 Podjela prema načinu dobivanja.....	6
1.2.2 Podjela prema učinku na bakterije .....	6
1.2.3 Podjela na osnovu antimikrobnog spektra .....	7
1.2.4 Podjela prema kemijskoj strukturi .....	7
1.2.5 Podjela prema mehanizmu djelovanja.....	7
1.3 MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA.....	8
1.3.1 Antibiotici koji inhibiraju sintezu stanične stijenke.....	8
1.3.2 Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu.....	9
1.3.3 Antibiotici koji djeluju na inhibiciju sinteze proteina na ribosomima .....	9
1.3.4 Antibiotici koji djeluju na inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina .....	10
1.3.5 Antibiotici koji blokiraju ključne metaboličke puteve .....	10
1.4 ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA .....	10
1.4.1 Primarna rezistencija .....	11
1.4.2 Sekundarna rezistencija .....	12
1.5 MEHANIZMI SEKUNDARNE REZISTENCIJE.....	13
1.5.1 Promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika .....	13
1.5.2 Inaktivacija antibiotika stvaranjem enzima .....	14
1.5.3 Smanjena permeabilnost bakterijske stanične stijenke .....	14
1.5.4 Pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpe .....	15
1.6 POKRIJEKLO SEKUNDARNE ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE .....	15
1.6.1 Kromosomska rezistencija .....	15
1.6.2 Ekstrakromosomska rezistencija.....	16
1.6.3 Unakrsna rezistencija.....	17
1.7 OPĆE KARAKTERISTIKE PORODICE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	18
1.7.1 Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
1.7.2 Rezistencija <i>Enterobacteriaceae</i> na $\beta$ -laktamske antibiotike.....	20

1.7.3 $\beta$ -laktamaze i njihova klasifikacija .....	22
1.8 REZISTENCIJA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> NA KARBAPENEME .....	24
1.8.1 Tipovi i klasifikacija karbapenemaza .....	25
1.9 ESBL IZOLATI PORODICE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	26
1.10 ORGANIZACIJE KOJE SE U HRVATSKOJ BAVE PRAĆENJEM REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE I NJIHOVOM POTROŠNJOM .....	28
1.11 REZISTENTNI IZOLATI U VANBOLNIČKOJ I BOLNIČKOJ POPULACIJI .....	29
1.12 REZERVOARI REZISTENTNIH BAKTERIJA I GENA ZA REZISTENCIJU .....	31
1.13 ULOGA DIJAGNOSTIKE U BORBI PROTIV AMR-a: FENOTIPSKA I GENOTIPSKA DIJAGNOSTIKA	33
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	34
3. MATERIJALI I METODE .....	35
3.1 VREMENSKI PERIOD ISTRAŽIVANJA .....	35
3.1.1 Hranjive podloge, aparatura i pribor, kemikalije .....	35
3.2 BIOKEMIJSKI TESTOVI .....	36
3.2.1 Kliglerov trostruki šećer .....	37
3.2.2 Simmonsov citratni agar .....	38
3.2.3 Laktoza .....	38
3.2.4 Lizin i ornitin .....	38
3.2.5 Urea .....	39
3.2.6 HIP .....	39
3.3 TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA PORODICE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> NA ANTIBIOTIKE .....	39
3.3.1 Interpretacija antibiograma .....	41
3.3.2 Fenotipsko ispitivanje produkcije $\beta$ -laktamaza proširenog spektra .....	42
4. REZULTATI .....	44
4.1 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	47
5. RASPRAVA .....	49
6. ZAKLJUČAK .....	56
7. LITERATURA .....	57
8. ŽIVOTOPIS .....	64

## 1. UVOD

Pojam "zaraznosti" je poznat koncept još od najranijih epoha ljudske povijesti. S obzirom na ljudsku znatiželju, postojala je težnja za razumijevanjem prirode infektivnih bolesti. U 17. stoljeću, Anton van Leeuwenhoek bio je prvi koji je opisao postojanje mikroorganizama. Nakon toga, tijekom idućih godina, formirane su prve klasifikacije bakterija. U 19. stoljeću, otkriveno je da su mikroorganizmi uzročnici infektivne bolesti (Kalenić i sur. 2013). Ne samo da je ljudska znatiželja pridonijela razumijevanju prirode infektivnih bolesti, već je i ključna i za otkriće antibiotika koji bi mogli efikasno stati na kraj zaraznim bolestima. Putujući kroz povijest infektivnih bolesti moguće je uvidjeti podjelu u tri razdoblja: era prije antibiotika, era antibiotika tzv. zlatno doba i era nastanka antimikrobne rezistencije (AMR) tj. post antibiotika era. Četrdesetih godina 20-tog stoljeća počinje era zlatnog doba. Otkriće antibiotika značajno je promijenilo medicinski svijet jer se njihovom primjenom uvelike smanjuje morbiditet i mortalitet (Kosalec i sur. 2021). Antibiotici nastali nakon "zlatnog doba" uglavnom su rezultat polusintetskih ili sintetskih kemijskih modifikiranja već poznatih antibiotika (Bbosa i sur. 2014). Uz mnoštvo korisnih učinaka, antibiotici ispoljavaju i negativne, među kojima se ističe antimikrobna rezistencija, koju je već nagovijestio *sir* Alexander Fleming. Negativni učinci antibiotika ne tiču su samo pojedinca, već i cijele populacije. Budući da se mikroorganizmi mogu prenositi s jednog čovjeka na drugog, nastali rezistentni organizam kod jedne osobe ujedno znači i nastanak rezistencije u populaciji (Kalenić 2000). Dugi niz godina činjenica oko rezistencije bivala je ignorirana od strane mnogih zdravstvenih institucija kao i djelatnika, ali i samih građana koji bi samoinicijativno uzimali antibiotike. U međuvremenu rezistencija je uvelike uzela maha pa je taj problem najbolje opisan kao „tihan tsunami“. Predviđa se kako će tijekom druge polovice 21. stoljeća godišnje zbog rezistencije umirati 10 milijuna ljudi, što je više nego li od predviđanja za smrtnost od malignih oboljenja (Kosalec i sur. 2021). Prema Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) oko 70% bakterijskih infekcija u bolničkom okruženju je rezistentno barem na jedan antibiotik (Bbosa i sur. 2014). Rezistencija na antibiotike nadmašila je proizvodnju novih antibiotika jer razvoj rezistencije se odvija puno brže u odnosu na razvoj novih antibiotika, koji teče jako sporo ili pak nikako. Naime, teško je pronaći nove načine u dizajniranju antibiotika, ali neupitna je činjenica kako farmaceutska industrija pronalazi interese isključivo za proizvodnju samo onih lijekova koji se dugoročno koriste, a ne za one koji se kratkoročno koriste kao npr. antibiotici. Do neracionalne primjene antibiotika dolazi i zbog njihove relativno niske cijene na tržištu. Zbog razvitka rezistencije na skoro svaki antibiotik, vijek antibiotika na tržištu je izuzetno ograničen. Neadekvatna, neracionalna i često nepotrebna upotreba antibiotika u kliničkoj praksi glavni su pokretači razvitka AMR-a. AMR je prirodni proces jer većina antimikrobnih tvari je prirodnog porijekla i

njihova produkcija ujedno je mikrobima jedan od kompetitivnih mehanizama koji im omogućuje opstanak u prirodi. Međutim zloupotreba antibiotika kod ljudi i životinja ubrzava proces AMR-a te je time pažnja usmjerena na sekundarnu AMR nastalu uslijed stalnog selektivnog pritiska (Kosalec i sur. 2021).

Bakterije mogu posjedovati nekoliko mehanizama rezistencije na antibiotike te ih prenositi na potomstvo. Geni rezistencije mogu se nalaziti na kromosomima, plazmidima, transpozonomima, integronima i bakteriofagima. Oni koji su na kromosomima prenose se direktno s jedne generacije na drugu, za razliku od onih koji nisu na kromosomima i koji se prenose horizontalnim prijenosom između bakterija iste ili različite vrste ili rodova. Budući da je stalni porast AMR-a gorući problem globalnog zdravstva, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) svrstala je AMR među četiri najveće prijetnje globalnog javnog zdravstva 21. stoljeća (Munita i sur. 2016). Isprva je pažnja bila usmjerena samo na rezistenciju Gram pozitivnih bakterija, osobito meticilin-rezistentnih stafilokoka (MRSA) i vankomicin-rezistentnih bakterija. Međutim početkom 21. stoljeća Gram negativne bakterije preuzimaju sve više pažnje glede rezistencije, posebice pojava multiplorezistentnih rezistentnih *Enterobacteriaceae* (eng. „multiple drug resistant“, MDR). Čest uzročnik infekcija kod pacijenata jesu upravo bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, te njihov razvitak rezistencije na antimikrobne lijekove dovodi do otežanog liječenja pacijenata. Do velike zabrinutosti dolazi zbog sve češća rezistencije *Enterobacteriaceae* na karbapeneme koji se koriste kao posljednja linija obrane liječenja od bakterijskih infekcija (Tambić Andrašević i sur. 2012). Najizazovniji problem u kliničkom okruženju su *Enterobacteriaceae* koje pokazuju rezistenciju na cefalosporine III. generacije. Ove bakterije stvaraju tzv.  $\beta$ -laktamaze širokog spektra (eng. extended spectrum beta-lactamases, ESBL). ESBL enzimi su produkt točkastih mutacija te su 1980-tih identificirani prvi ESBL izolati. Najčešće su prisutni u *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, ali nalaze se i kod drugih bakterija. ESBL izolati često pokazuju rezistenciju na razne antibiotike, što otežava liječenje i povećava smrtnost, posebno u bolnicama. S obzirom na to, bitno je da se identificiraju i adekvatno tretiraju pravilnim izborom antibiotika. Na žalost, broj ESBL-producirajućih izolata je u stalnom porastu što je rezultat pretjerane i nepravilne upotrebe antibiotika (Samaha-Kfoury i Araj 2003).

### 1.1 UVOD U ANTIBIOTIKE

Antibiotici (grč. anti=protiv; bios=život) su mali sekundarni metaboliti prirodno nastali u mikroorganizmu iz kojeg se izoliraju. Mogu biti kemijski sintetizirani po uzoru na prirodne, a cilj im je uništavanje patogenih mikroorganizama koji su uzročnici infekcija (Kosalec i sur. 2021). Imaju visoku fiziološku aktivnost u liječenju infekcija protiv bakterija, gljivica i parazita tako što im sprječavaju rast tj. imaju bakteriostatski učinak ili ih pak ubijaju tj. imaju baktericidni učinak. Prema vrsti organizma na kojeg djeluju mogu se klasificirati na: (1) antibakterijske; (2) antivirusne; (3) antifungalne; (4) antiprotozoike; (5)

antihelmintike. Drugim riječima to su farmakološki agensi koji pokazuju selektivnu toksičnost prema mikroorganizmima, vrlo malo su toksični za organizam domaćina, odnosno čine minimalne značajne štete za domaćina. Mogu biti prirodnog porijekla, polusintetski ili sintetski. Antibiotici prirodnog porijekla produkt su proizvodnje mikroorganizama (uglavnom bakterija tla) i plijesni, a polusintetski ili sintetski su derivati dobiveni kemijskim putem u laboratorijskim uvjetima i proizvodnim pogonima. Pri djelovanju antibiotici nisu sposobni razlikovati patogene od nepatogenih bakterije koje su sastavni dio ljudske normalne flore i zbog toga dolazi do nastanka rezistentnih gena koji se skladište u prirodi. To predstavlja ogromni problem jer se rezistentne bakterije teže ili pak nikako ne mogu izliječiti (Kalenić i sur. 2013).

U upotrebi su oko šezdesetak godina, a masovna upotreba antibiotika počela je tijekom Drugog svjetskog rata (Baylay i sur. 2015). Zadnjih 60-ak godina u kliničkoj praksi koriste se prirodni spojevi koji su porijeklom iz skupine bakterija *Actinomycetes*, ujedno najvećih prirodnih proizvođača antibiotika (Payerl-Pal 2009). Osim njih, glavni izvori antibakterijskih metabolita dolaze iz rodova *Streptomyces*, *Penicillium* i *Bacillus* (Bbosa i sur. 2014). Antibiotici se najviše razlikuju u odnosu na druge lijekove po tome što oni nemaju djelovanje samo na pojedinca koji ih primjenjuje i na određeni mikroorganizam već i na populaciju u cijelosti (Payerl-Pal 2009).

Za procjenu učinkovitosti antibiotika koristi se termin minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). MIK je najmanja koncentracija antimikrobnog agensa koja zaustavlja ili inhibira rast mikroorganizama i obično se izražava u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g/mL}$ ) ili miligramima po litru ( $\text{mg/L}$ ). Ima izrazitu važnost u kliničkom okruženju jer zahvaljujući vrijednostima MIK-a moguće je odrediti točnu osjetljivost uzročnika na određeni antibiotik, izabrati odgovarajuću dozu antibiotika jer što je vrijednost MIK-a niža za određeni antibiotik tim je djelovanje antibiotika učinkovitije tj. uzročnik infekcije je dobro osjetljiv na antibiotik (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010; Livermore 1995).

### 1.1.1 Povijest antibiotika

Prije otkrića antibiotika, zarazne bolesti poput upale pluća, difterije i proljeva bile su jedan od vodećih uzoraka smrtnosti. Tijekom 19. stoljeća dolazi do industrijske revolucije koja dovodi do urbanizacije te se velik broj stanovništva seli iz sela u grad što kao posljedicu ima pojavu zaraznih bolesti među kojima se ističu sifilis i tuberkuloza (Zaffiri sur. 2012). Kroz tisućljeća, drevne civilizacije poput starih Grka i Egipćana koristile su mikrobe koji proizvode antibiotike, biljke, tlo i pljesni za liječenje bakterijskih infekcija. Primjerice, za liječenje kožnih infekcija koristili su pljesnivi kruh (Hutchings i sur. 2019). Sve je pak upućivalo ka tome kako postoje određeni metaboliti koji omogućavaju učinkovito liječenje infekcija. Krajem 19. stoljeća dolazi do revolucionarnih promjena u borbi protiv bakterijskih infekcija. Naime, Robert

Koch i Louis Pasteur dokazali su uzročnike infekcija tj. mikroorganizme. Svrha medicinskog liječenja jest prvo pronaći uzročnika bolesti, a potom i lijek protiv uzročnika bolesti. Pasteur je koristio metabolite „dobrih“ bakterija, kako bi uništio djelovanje patogenih bakterija. On je bio zagovornik teorije kako mikrobi mogu lučiti metabolite kojim ubijaju bakterije. Njemački doktor Paul Erlich zalagao se za korištenje kemijskih tvari u borbi protiv patogena te je 1904. godine otkrio kemoterapeutsku tvar nazvavši ju *Trypan Red*. Njom je uspješno izliječio miša zaraženog tripanosomom. Potom, 1910. godine isti znanstvenik zaslužan je za otkriće spojeva arsena. Jedan od glavnih lijekova iz skupine arsena bio je tzv. Salvarsan koji se koristio za liječenje protiv uzročnika sifilisa, *Treponema pallidum*. Salvarsan je bio prvi sintetički proizvedeni antibiotik. Početci razvoja antibiotika pronalaze temelje u teoriji koju je zagovarao Erlich, a to je teorija o „čarobnim metcima“ u kojoj Erlich govori o lijekovima koji bi specifično djelovali na određenog patogena, a da pri tome nemaju štetan utjecaj na stanice domaćina (Valent i sur. 2016). Nakon otkrića Salvarsana, bakteriolog Gerhard Domagk otkrio je sulfonamidne lijekove od kojih je prvi poznati bio pod trgovačkim imenom Prontosil. Prontosil je pružio zapanjujuće kliničke uspjehe koji su doveli do značajnog smanjenja mortaliteta u teškim bolestima poput meningitisa, pneumonije i dječje groznice. Sulfonamidi su bili prvi istinski učinkoviti antimikrobni lijekovi širokog spektra u kliničkoj uporabi i još uvijek su u upotrebi, ali su uvelike potisnuti otkrićem penicilina (Hutchings i sur. 2019) .

Za otkriće prvog prirodnog antibiotika, a samim time i najvažnije otkriće medicine zaslužan je škotski liječnik i znanstvenik Alexandar Fleming. On je 1928. godine sasvim slučajno otkrio penicilin tako što je proučavao kulturu stafilokoknih bakterija te je nepokrivenu Petrijevu zdjelicu ostavio kraj prozora. Nakon određenog vremena uočio je kontaminaciju u Petrijevoj zdjelici sporama plijesni oko kojih bakterije nisu rastle tj. uvidio je područje inhibicije rasta bakterija oko plijesni. Izolirao je plijesan i otkrio da je riječ o rodu *Penicillium*. Produkt plijesni nazvao je penicilinom i on je odgovoran za ubijanje bakterija (Tan i Tatsumura 2015). Na brojnim istraživanjima penicilina radili su znanstvenici Howard Florey i Ernst Chain. Oni su uzgajali gljivice, izolirali penicilin i tretirali miševe zaražene bakterijama. Miševi su ozdravili te su tako utvrdili kako penicilin ima nisku toksičnost na laboratorijske životinje. Također su zaslužni za pročišćavanje penicilina i opisivanje strukture penicilina. Otkrili su fizikalna i kemijska svojstva penicilina, kao i to da je pogodan za liječenje streptokokne infekcije. Od 1944. penicilin je ušao u široku uporabu. Mnogi su ga nazivali „magičnim lijekom“ (Gould 2016). Zajedno sa Flemingom, Florey i Chain su 1945. godine dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu (Tan i Tatsumura 2015). Fleming je na dodjeli za Nobelovu nagradu upozorio kako neracionalna upotreba antibiotika može rezultirati gorućim problemom-rezistencijama (Högberg i sur. 2010).

Od otkrića penicilina, svaka naredna godina smatrala se uspješnom jer su to bile godine otkrića raznih antibiotika. Tako je 1939. godina bila uspješna jer je Rene Dubos otkrio gramicidin. To je antibiotik koji djeluje samo na Gram pozitivne bakterije, ali je vremenom ustanovljeno da je on vrlo toksičan ukoliko se primjenjuje intravenski te je danas njegova primjena vidljiva samo kod lakših kožnih infekcija (Takada i sur. 2020). Otkriće penicilina i brojni izvještaji o proizvodnji antimikrobnih spojeva od strane mikroorganizama naveli su Selman Waksman-a 1930-tih na intenzivno proučavanje mikroba kao proizvođača antimikrobnih spojeva (Hutchings i sur. 2019). On je zajedno s Albert Schatz i Elizabeth Bugie otkrio antibiotik iz bakterije *Streptomyces griseus*. Dali su mu naziv streptomycin i upravo je to antibiotik koji je izliječio prvog tuberkuloznog pacijenta ikada u povijesti (Zaffiri i sur. 2012). Waksman je još poznat po tome što je prvi koristio izraz antibiotik, te je 1945. godine dobio Nobelovu nagradu. On definira antibiotik kao spoj nastao u mikroorganizmu koji je odgovoran za uništenje drugih mikroorganizama. Njegovim radom započelo je zlatno doba otkrića antibiotika (Hutchings i sur. 2019).

Slijedeća ključna godina u eri antibiotika jest 1945. kada je Giuseppe Brotzu izolirao gljivicu *Cephalosporium acremonium* iz kanalizacijske vode u Cagliariju na Sardiniji u Italiji i tako otkrio cefalosporine tj. cefalosporin C. On se pokazao efikasan protiv Gram pozitivnih bakterija rezistentnih na penicilin, ali i protiv nekih Gram negativnih bakterija (Bo 2000). Razdoblje od 1950 pa do 1970. godine smatra se „zlatnom erom“ u kojoj se otkrio cijeli spektar antimikrobnih lijekova. Većina tada otkrivenih antibiotika i danas je u kliničkoj upotrebi, ali je uvelike njihova učinkovitost pala pojavom rezistencije. Od tada nisu otkrivene nove klase antibiotika, već se glavni pristup na razvoju novih antibiotika za borbu protiv rezistencija temelji na modifikaciji postojećih antibiotika (Aminov 2010).

Od razvoja flourokinolona, početkom 1970-tih, nisu se razvile nove veće skupine antimikrobnih lijekova (Fouz i sur. 2020). Posljednji klinički učinkovit antibiotik iz nove skupine bio je daptomicin. On je otkriven 1986. godine, međutim sve do 2003. godine nije bio odobren za upotrebu. Većina antibiotika koji su u današnjem kliničkom ispitivanju derivati su već poznatih spojeva antibiotika. Relativno brzo i lako otkriće antibiotika u kratkom vremenskom periodu dovelo je do njihove prekomjerne upotrebe te kada se tome pridoda neuspješno otkrivanje novih antibiotika to je rezultat trenutačne situacije s visokom stopom AMR-a (Hutchings i sur. 2019). Jako malo saznanja postoji o biologiji antibiotika i njihovoj ulozi u mikrobnj ekolojiji. Farmaceutske tvrtke se vode pretpostavkom ako bi se istraživanja više posvetila ka prirodni funkcioniranja antibiotika možda bi se došlo do bolje opremljenosti za otkrivanje novih antibiotika kao i njihove najbolje upotrebe u zdravstvenoj skrbi (Davies 2006). Razumijevanje biokemijskog i genetskog temelja rezistencije omogućilo bi učinkovitu strategiju za smanjenje rezistencije na antibiotike i bolji razvoj

antimikrobnih lijekova (Kosalec i sur. 2021). Jedan od razloga ne otkrivanja novih antibiotika nakon Zlatnog doba jest što pojedina okolišna područja nisu bila poznata ili su pak bila nedostupna te tako nije bilo moguće pronaći nove metabolite za proizvodnju antibiotika. Danas je poznato kako velik broj beskralježnjaka, uključujući kukce i morske spužve, kao i većina kopnenih biljaka tvore obrambene i uzajamno korisne simbioze s bakterijama koje proizvode antibiotike. Otkrićem novih metoda i alata omogućilo se istraživanje do tada nepristupačnog okoliša kao npr. morskog. Istraživanjem morskog okoliša otkriveno je da su morski aktinomiceti roda *Salinospora* bogat izvor novih prirodnih spojeva kao što je salinosporamid A, koji ima antikancerogeno djelovanje. U obzir se posebice uzimaju bakterijski simbionti morskih beskralježnjaka poput spužvi koje su bogat izvor novih spojeva. Primjerice vrste *Candidatus entotheonella* su nekultivirani simbionti morske spužve *Theonella swinhoei*. Proučavajući ih pokazalo se da proizvode gotovo sve bioaktivne poliketide i modificirane peptide (Hutchings i sur. 2019).

## **1.2 PODJELA ANTIBIOTIKA**

Antibiotici se klasificiraju prema nekoliko kategorija: (1) načinu dobivanja, (2) učinku na bakterije, (3) antimikrobnom spektru, (4) mehanizmu djelovanja na bakterije, (5) kemijskoj strukturi (Kalenić i sur. 2013; Walsh 2003).

### **1.2.1 Podjela prema načinu dobivanja**

Prema načinu dobivanja tj. podrijetlu antibiotici se dijele na: (1) prirodne, (2) polusintetičke i (3) sintetičke spojeve. Antibiotici prirodnog porijekla dobivaju se proizvodnjom metabolizma bakterija, gljivica ili plijesni, dok su sintetski ili polusintetski antibiotici derivati koji se proizvode kemijskim putem. Danas se prirodni antibiotici uglavnom modificiraju ili dorađuju u laboratorijskim uvjetima kao i u pogonima. Iz mikrobnih izvora do sada je izolirano oko 400 različitih antibiotika dok je pripremljeno više od 30 000 sintetskih i polusintetskih antibiotika. Unatoč tolikom broju različitih antibiotika, u kliničkoj praksi se koristi oko 100 različitih (Kalenić i sur. 2013).

### **1.2.2 Podjela prema učinku na bakterije**

Prema djelovanju na bakterije dijele se na bakteriostatike i baktericide. Bakteriostatici su skupine antibiotika koje inhibiraju diobu mikroba pri čemu ih direktno ne ubijaju. Kada se antibiotik ukloni, bakterija se ponovo može umnažati. Baktericidni antibiotici ubijaju mikrobe. Pojedini antibiotici mogu djelovati baktericidno na sve bakterije u svojem spektru, dok pak drugi mogu djelovati na neke bakterije bakteriostatski, a na druge baktericidno. Određene vrste bakteriostatskih antibiotika u visokim koncentracijama mogu djelovati baktericidno (Kalenić i sur. 2013).



### 1.2.3 Podjela na osnovu antimikrobnog spektra

Na osnovu djelovanja antimikrobnog spektra mogu se podijeliti na antibiotike uskog i širokog spektra djelovanja. Antibiotici uskog spektra djeluju samo na jednu ili nekoliko bakterijskih vrsta, dok antibiotici širokog spektra djeluju na većinu Gram pozitivnih i negativnih bakterija (Walsh 2003).

### 1.2.4 Podjela prema kemijskoj strukturi

Prema kemijskoj strukturi antibiotici se dijele na 15-tak većih skupina (Kalenić i sur. 2013; Walsh 2003):

- $\beta$ -laktamski antibiotici (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami, inhibitori  $\beta$ -laktamaza)
- glikopeptidi (kolistin, vankomicin, teikoplanin)
- aminoglikozidi (gentamicin, amikacin, streptomycin)
- makrolidi (azitromicin, eritromicin, klaritromicin)
- fluorokinoloni (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin)
- tetraciklini (tetraciklin, doksiciklin, minociklin, oksitetraciklin, tigeciklin)
- sulfonamidi (trimetoprim + slufametoksazol)
- ketolidi (telitromicin)
- streptogramini (quinupristin, dalfopristin)
- oksazolidinoni (linezolid, tedizolid)
- kloramfenikol
- linkozamidi (klindamicin)
- nitrofurani (nitrofurantoin)
- fosfonati (fosfomicin)

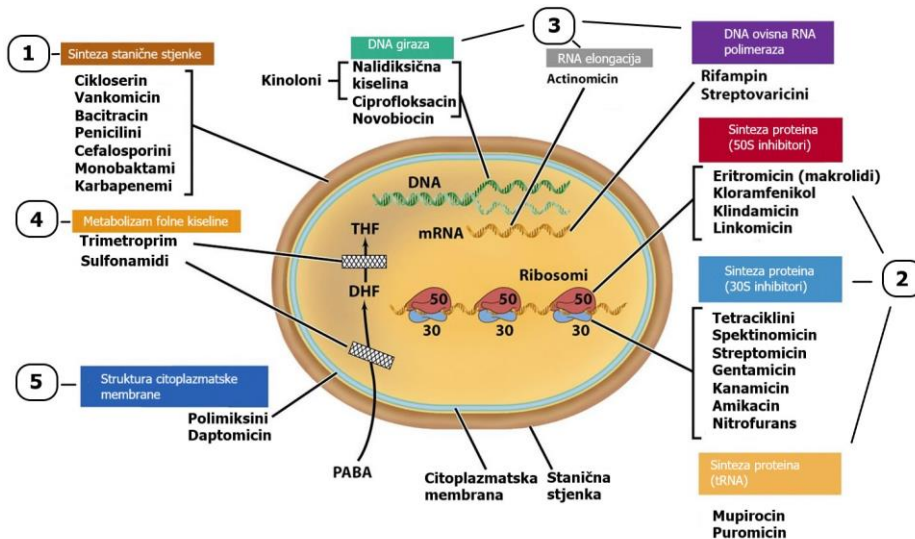
### 1.2.5 Podjela prema mehanizmu djelovanja

Prema mehanizmu djelovanja na mikrobe antibiotici se dijele na (Slika 1):

- a) inhibitore sinteze stanične stijenke bakterija (npr. betalaktamski antibiotici)
- b) antibiotike koji djeluju na citoplazmatsku membranu (npr. polimiksini)
- c) inhibitori sinteze proteina na ribosomima (npr. tetraciklini, aminoglikozidi)
- d) inhibitori sinteze nukleinskih kiselina (npr. kinoloni, rifampicini) (Kalenić i sur. 2013)
- e) antibiotici koji blokiraju ključne metaboličke puteve (Etebu i Arikekpar 2016).

### 1.3 MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIBIOTIKA

Bakterije posjeduju različite mehanizme kojim djeluju na antibiotike. Glavni cilj antibiotika je narušiti vitalne procese bakterijske stanice onemogućivši joj diobu. Pri tom biva narušen genski integritet bakterijske stanice. Antibiotici trebaju biti selektivno toksični, odnosno imati minimalne štetne učinke na ljudski organizam (Khawcharoenporn i sur. 2008). Da bi antibiotik efikasno narušio integritet bakterijske stanice, mora djelovati unutar nje, dosegnuvši svoj cilj u bakterijskoj stanici u adekvatnoj količini, a da pritom ne bude inaktiviran ili izmijenjen. U suprotnom, postaje neučinkovit. Na slici 1 prikazani su mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu (Etebu i Ariekpar 2016).



**Slika 1.** Prikaz mehanizma djelovanja antibiotika: (1) inhibicija sinteze stanične stijenke, (2) inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, (3) interferencija sinteze nukleinskih kiselina, (4) blokiranje metaboličkih puteva i (5) povećanje propusnosti stanične membrane.

Preuzeto i prilagođeno iz Bbosa i sur. (2014).

#### 1.3.1 Antibiotici koji inhibiraju sintezu stanične stijenke

Bakterijske stanice posjeduju staničnu stijenku koja je vanjski kruti sloj i okružuje protoplast bakterijske stanice, a njezina uloga je: (1) osiguravanje stalnog oblika stanice, (2) zaštita stanice od negativnog utjecaja osmotskog tlaka tj. sprječava osmotsku lizu stanice, (3) zaštita stanice od mehaničkih

ozljeda kao i (4) sprječavanje prolazak toksičnih tvari. Najvažnija komponenta koja izgrađuje staničnu strukturu je peptidoglikan građen poput mrežice od N-acetil-muraminske kiseline i N-acetilglukozamina. Na N-acetil-muraminsku kiselinu i N-acetilglukozamin poprečno su vezani tetrapeptidi i pentapeptidi. Za umrežavanje tih molekula ključni su enzimi karboksipeptidaze, transpeptidaze i endopeptidaze. Oni se nazivaju proteinima koji vežu penicilin (eng. penicillin binding protein, PBP) (Bedenić 2009). Najznačajniji antibiotici koji djeluju na sintezu stanične stijenke su glikopeptidni antibiotici i  $\beta$ -laktami (Kalenić i sur. 2013). Na PBP molekule se vežu  $\beta$ -laktami (npr. penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenemi i inhibitori  $\beta$ -laktamaze) dok se na krajeve pentapeptida vežu glikopeptidi (npr. vankomicin) i njihovo djelovanje dovodi do inhibicije sinteze peptidoglikana. Zbog toga bakterijska stanica nije u stanju održati osmotski gradijent te dolazi do bubrenja i u konačnici pucanja stanice. Djelovanje antibiotika dovodi i do lize stanice jer antibiotici inaktiviraju inhibitore autolitičkih enzima (Bedenić 2009). Dakle, antibiotici djeluju na sintezu prekursora peptidoglikana ili pak na sastavljanje prekursora u staničnoj stijenci i formiranje peptidoglikanskog sloja. Budući da ljudske stanice nemaju peptidoglikan moguće je postići veliku selektivnu toksičnost (Kalenić i sur. 2013).

### **1.3.2 Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu**

Citoplazmatska membrana je polupropusna i okružuje citoplazmu. Ona predstavlja selektivnu permeabilnu barijeru i uloga joj je kontrola unutarnjeg sastava stanice te je mjesto gdje se događa aktivni transport tvari. U bakterijskoj strukturi nalaze se lipidi i proteini, a glavni sastojci bakterijskih lipida su fosfolipidi. Antibiotici koji djeluju na citoplazmatsku membranu su polimiksini. Oni ometaju funkcioniranje citoplazmatske membrane. Dovode do prekida kontinuiteta odnosno cjelovitosti membrane što omogućava izlazak iona i makromolekula iz bakterijske stanice te u konačnici dolazi do oštećenja ili pak smrti bakterijske stanice. Sastav ljudske citoplazme u odnosu na bakterijsku je nešto malo drukčiji, pa je s ovim antibioticima moguće postići određenu selektivnu toksičnost (Kalenić i sur. 2013; Bedenić 2009).

### **1.3.3 Antibiotici koji djeluju na inhibiciju sinteze proteina na ribosomima**

Sinteza proteina odvija se na ribosomima bakterija, prema kalupu mRNA, a cijeli proces se zove translacija ili prevođenje i odvija se kroz tri faze (inicijacija, elongacija i terminacija). Antibiotici djeluju na bakterijske ribosome (70S) koji imaju dvije podjedinice, jednu veću 50S i jednu manju 30S (Cooper i Hausman, 2010). Do inhibicije sinteze proteina dolazi tako što se antibiotici vežu za ribosome inhibirajući različite faze translacije. Mehanizam djelovanja većine antibiotika jest inhibicija sinteze proteina na ribosomima. Toj skupini antibiotika pripadaju: aminoglikozidi, makrolidi, tetraciklini, linkozamidi, oksazolidinoni i kloramfenikoli. Tako npr. aminoglikozidi čitaju pogrešno genetski kod, makrolidi pak

inhibiraju aktivnost peptidil-transferaznog centra koji stvara peptidne veze između aminokiselina, a tetraciklini uzrokuju blokiranje vezanja amino-acil tRNA na A mjesto na ribosomu. Djelovanjem navedenih antibiotika moguće je postići selektivnu toksičnost jer bakterijski ribosomi se razlikuju od ljudskih ribosoma (Kalenić i sur.2013; Bedenić 2009).

#### **1.3.4 Antibiotici koji djeluju na inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina**

Kinoloni, rifampicini, metronidazol, sulfonamidi i trimetoprim su antibiotici koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina bakterijske stanice tj. inhibiraju enzime koji su ključni u biosintetskom putu nukleinskih kiselina. Sprječavanje sinteze nukleinskih kiselina je učinkovit način djelovanja antibiotika (Kalenić i sur.2013). Npr. kinoloni kod Gram negativnih bakterija inhibiraju sintezu bakterijske DNA tako što djeluju na DNA girazu, dok kod Gram pozitivnih bakterija djeluju na topoizomerazu IV i tako inhibiraju sintezu DNA (Bedenić 2009).

#### **1.3.5 Antibiotici koji blokiraju ključne metaboličke puteve**

Metabolizam omogućuje stanicama dobivanje energije za različite biološke aktivnosti. Ako dođe do oštećenja enzima koji sudjeluju u metabolizmu, stanice postaju nesposobne za normalno funkcioniranje. Antibiotici poput sulfonamida i trimetroprima inhibiraju sintezu metaboličkih puteva. Oni se ponašaju kao supstrat za enzim koji je potreban za stanični metabolizam bakterija. Djeluju poput tetrahidrofolata koji je nužan za sintezu folne kiseline u bakterijskim stanicama i tako blokiraju ključne korake u sintezi folata. Folna kiselina je od vitalnog značaja u metabolizmu nukleinske kiseline i aminokiselina te zbog tog razloga navedeni antibiotici u konačnici ometaju sintezu nukleinskih kiselina i aminokiselina budući da oponašaju supstrate potrebne za metabolizam folne kiseline (Kirmusaoğlu i sur. 2019; Etebu i Arikepar 2016).

### **1.4 ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA**

Sir Alexander Fleming je već na dodjeli Nobelove nagrade upozorio da će neracionalna i nestručna upotreba antibiotika dovesti do razvitka AMR (Hutchings i sur. 2019). AMR je otpornost bakterija na bakteriostatsko i baktericidno svojstvo antibiotika tj. ne djelovanje antibiotika na bakterijsku stanicu pri maksimalnoj koncentraciji koja se može dati ljudskom organizmu (Kalenić i sur. 2013). Djelovanje antibiotika na bakterijsku stanicu dovodi do stresa pri čemu se bakterija nastoji adaptirati na nepovoljne uvjete koji djeluju na nju tako što je podložna mutacijama kao i izmjeni genetičkog materijala s drugim bakterijama. Na takav način se razvija rezistencija prema antibiotskoj terapiji (Zaman i sur. 2017). Bakterije su razvile rezistenciju gotovo na svaki antibiotik, a sam način nastanka je raznolik: od izmjena genetskog materijala između bakterija, male promjene u genomu (točkaste mutacije), gubitka transpozona, unosa

vanjske DNA, ali prije svega se treba uzeti u obzir da je glavni pokretač AMR-a neracionalna upotreba antibiotika, odnosno antropogeni utjecaj (Tambić Andrašević i sur. 2018).

Prisutnost AMR-a vidljiva je među Gram pozitivnim i negativnim bakterijama, ali pak ozbiljnu opasnost predstavljaju MDR bakterije. To su bakterije koje su istovremeno rezistentne na različite antibiotike, odnosno rezistentne na bar jedan antibiotik iz tri ili više kategorija antibiotika (Golkar i sur. 2014). Rezistencija bakterija na antibiotike može biti primarna (urođena ili intrinzična) i sekundarna (stečena ili ekstrinzična) koja nastaje kao posljedica mutacija u kromosomskim genima ili zbog horizontalnog prijenosa gena (Kalenić i sur. 2013).

Rezistencija bakterija na antibiotike je prirodni fenomen jer je većina antimikrobnih tvari stvorena u prirodi i na njih su ko-rezidentne bakterije (one koje obitavaju u okolišu) razvile mehanizme rezistencije kako bi uspjele preživjeti u takvoj okolini. Takvi mikroorganizmi se nazivaju primarno rezistentnim na jednu ili više antimikrobnih tvari. Međutim, primarne bakterije nisu glavni fokus AMR-a već sekundarne bakterije tj. bakterije koje razvijaju sekundarnu rezistenciju (Kosalec i sur. 2021). Stručnjaci su godinama upozoravali kako se upotreba antibiotika treba racionalizirati. Upozorenja nisu shvaćena ozbiljno jer se nada polagala u proizvodnju novih antibiotika koji će riješiti problem. Pred kraj 20. st. postalo je jasno da se do novih antibiotika jako teško dolazi, a pri tom se rezistencija na postojeće rapidno širila. Budući da mnoga područja medicine ovise o učinkovitosti antibiotika, njihov gubitak djelotvornosti predstavlja jedan od gorućih problema medicine. Povećana rezistencija uzrokuje ozbiljne posljedice, uključujući rast stope smrtnosti, češća oboljenja te rast troškova liječenja (Tambić Andrašević i sur. 2018).

Prvu pojavu AMR-a otkrili su 1940. godine biokemičari Edward Penley Abraham i Ernst Boris Chain. Identificirali su izolat *Escherichia coli* koji je sintetizirao enzim penicilinazu koja je inaktivirala djelovanje penicilina njegovom razgradnjom (Lobanovska i Pilla 2017). AMR predstavlja posebnu zabrinutost u siromašnim državama, gdje je primjena antibiotika nekontrolirana. Vrlo zabrinjavajuće je da su u mnogim regijama svijeta uobičajene bakterijske infekcije postale smrtonosne. Europski i američki centri za prevenciju i kontrolu bolesti izvijestili su da u zemljama s visokim dohotkom u Europi i SAD-u svake godine zbog infekcija povezanih s AMR-om umre u prosjeku od 23 000-25 000 ljudi. U zemljama s niskim i srednjim dohotkom poput Indije i Tajlanda, AMR je odgovorna za smrt 58 000 djece i 38 000 odraslih (Fouz i sur. 2020).

#### **1.4.1 Primarna rezistencija**

Primarna rezistencija bakterija na antibiotike je nemogućnost djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu jer ona nema strukturnu ili biokemijsku karakteristiku na koju bi antibiotik djelovao. U bakterijskoj stanici ne postoji ciljno mjesto djelovanja antibiotika. Primjerice,  $\beta$ -laktami ili glikolipidi su vrsta antibiotika

koja djeluje na staničnu stijenku bakterija, ukoliko bakterija nema staničnu stijenku takvi antibiotici na nju neće djelovati (Kalenić i sur. 2013).

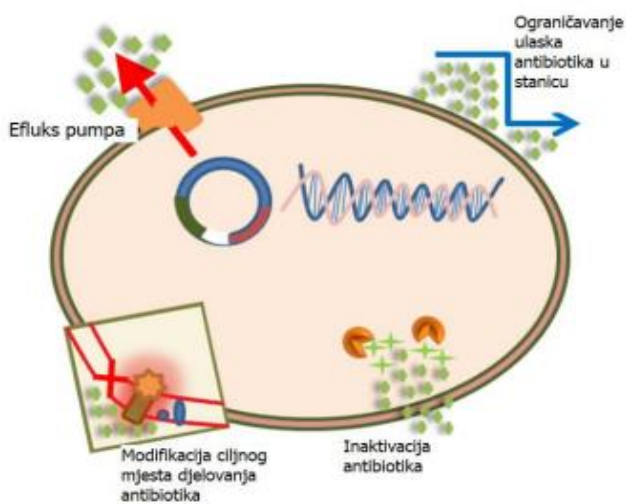
Prema spektru djelovanja na temelju primarne rezistencije, antibiotici se dijele na antibiotike širokog i uskog spektra djelovanja. Ukoliko je poznato koja bakterija je uzrokovala infekciju tada se propisuju antibiotici uskog spektra djelovanja npr. aminoglikozidi djeluju samo na aerobne i fakultativne bakterije, dok u anaerobnim uvjetima ne mogu djelovati na bakterijsku stanicu. Ako nije poznato koja bakterija je uzrok infekcije tada se propisuju antibiotici širokog spektra djelovanja kao npr. karbapenemi koji uglavnom djeluju na većinu bakterija. Primarna rezistencija je vidljiva i u tome u kojem stadiju se nalazi bakterijska stanica. U određenom stadiju bakterija može biti rezistentna na određeni antibiotik dok u drugom stadiju na isti taj antibiotik je osjetljiva (Kalenić i sur. 2013). Neovisna je o prethodnoj izloženosti antibioticima te nije povezana sa horizontalnim prijenosom gena. Najčešći bakterijski mehanizmi kod primarne rezistencije su smanjena propusnost vanjske membrane i prirodna aktivnost efluks pumpi (Reygaert 2018).

#### **1.4.2 Sekundarna rezistencija**

Sekundarna rezistencija nastaje kada bakterija, koja je prvotno bila osjetljiva na određeni antibiotik, postane neosjetljiva na učinak antibiotika. Nastaje kao proces prirodnih mutacija bakterijskog genoma, slučajnog nastanka gena rezistencije ili horizontalnim prijenosom gena rezistencije (Kalenić i sur. 2013). Bakterije koje su razvile sekundarnu rezistenciju prenose rezistentne gene putem horizontalnog ili vertikalnog prijenosa gena. Horizontalni prijenos gena je prijenos genetičkog materijala između raznih vrsta bakterija pomoći nekoliko mehanizama: transdukcija, transformacija i konjugacija. Vertikalni prijenos gena je prijenos genetičkog materijala s roditelja na potomke diobom (Sabtu i sur. 2015), odnosno dolazi do izravnog prijenosa gena na sve bakterijske potomke tijekom replikacije DNA te tako bakterije divljeg tipa (ne mutanti) su ubijene, a rezistentni mutant preživljava (Bbosa i sur. 2014). Rezistentni gen dovodi do promjena u bakteriji zbog kojih ona postaje rezistentna na djelovanje antibiotika. Bakterijski izolati su osjetljivi i imaju mali broj rezistentnih jedinki ukoliko se određeni antibiotik upotrebljava razumno, ali ako se upotrebljava neracionalno prevladat će rezistentni izolati u bakterijskoj populaciji (Kalenić i sur. 2013).

## 1.5 MEHANIZMI SEKUNDARNE REZISTENCIJE

Postoji nekoliko načina kojima bakterijske stanice djeluju na antibiotik kako bi se zaštitile od njega i to dovodi do nastanka sekundarne rezistencije. Mehanizmi sekundarne rezistencije su (Slika 2): (1) promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika, (2) produkcija enzima koji razgrađuje ili modificira antibiotik, (3) smanjenje propusnosti stanične stijenke za prolaz antibiotika, (4) pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice mehanizmom pumpe (efluks) (Kalenić i sur. 2013).



Slika 2. Prikaz mehanizama sekundarne antibiotske rezistencije.

Preuzeto i prilagođeno iz Reygaert (2018).

### 1.5.1 Promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika

Bakterijska stanica ima više meta koje su ciljno mjesto djelovanja antibiotika, ali isto tako sve te mete bakterije mogu modificirati. Budući da je bakterijama cilj zaštititi sebe od djelovanja antibiotika one su razvile različite strategije poput zaštite ciljnog mjesta na kojeg antibiotik djeluje ili pak modifikacija ciljnog mjesta. Vrlo male modifikacije ciljnog mjesta mogu dovesti do izostanka vezanja antibiotika za njega jer je interakcija između ciljnog mjesta i antibiotika izrazito specifična. Modifikacijom ciljnog mjesta smanjuje se afinitet antibiotika tj. antibiotik uđe u stanicu i dođe do ciljnog mjesta, ali se ne veže za njega zbog njegove promjene. Promjena ciljnog mjesta djelovanja antibiotika može biti posljedica točkastih mutacija u genima koji su odgovorni za kodiranje ciljnog mjesta, ali može nastati i zbog enzimskih promjena

ciljnog mjesta (pretežito metiliranjem). Bakterija može stvoriti nova ciljna mjesta koja nisu inhibirana tom antibiotskom molekulom i tako dolazi do zamjene ili zaobilaska ciljnog mjesta (Munita i Arias 2016). Mjesta koje bakterije najčešće modificiraju su specifična mjesta djelovanja antibiotika kao npr. 30S ili 50S podjedinice na ribosomu, proteini, DNA, RNA ili membranska struktura (Kapoor i sur. 2017). Primjerice fluorokinoloni djeluju na sintezu nukleinske kiseline bakterijske stanice i ona im je meta za koju se vežu. Ukoliko dođe do modifikacije DNA giraze ili topoizomeraze IV samim time dolazi do promjena u njihovoj strukturi što pak za posljedicu ima smanjenu ili nikakvu šansu da se antibiotik veže za navedene komponente, što rezultira rezistencijom na fluorokinolone (Reygaert 2018).

### 1.5.2 Inaktivacija antibiotika stvaranjem enzima

Bakterije mogu sintetizirati enzime kojima razgrađuju ili inaktiviraju antibiotike. Na transpozonima, plazmidima ili integronima nalaze se geni odgovorni za razgradnju ili inaktivaciju antibiotika. Ovaj mehanizam rezistencije predstavlja jedan od najznačajnijih mehanizama pomoću kojeg se bakterije suprotstavljaju djelovanju antibiotika (Munita i sur. 2016). Poznat je velik broj enzima koje bakterije sintetiziraju, a među njima se ističu  $\beta$ -laktamaze i karbapenemaze.  $\beta$ -laktamaze mogu sintetizirati Gram pozitivne i negativne bakterije i one kidaju amidnu vezu u  $\beta$ -laktamskom prstenu i tako inaktiviraju antibiotik. Dijele se na  $\beta$ -laktamaze širokog spektra, cefalosporinaze i penicilinaze. Karbapenemaze pripadaju skupini enzima koji djeluju na karbapeneme. Dijele se na karbapenemaze grupe A, B i D. Karbapenemaze iz grupe B najefikasnije razgrađuju karbapeneme, čime iskazuju najizraženiju rezistenciju prema njima u odnosu na druge tipove karbapenemaza (Bedenić 2009).

### 1.5.3 Smanjena permeabilnost bakterijske stanične stijenke

Ovaj mehanizam rezistencije više je vezan za Gram negativne nego Gram pozitivne bakterije koje nemaju vanjsku membranu. Smanjenje propusnosti vanjske membrane jedan je od glavnih mehanizama kojim se štite Gram negativne bakterije i tako sprječavaju ulazak antibiotika u bakterijsku stanicu (Silhavy i sur. 2010). Vanjska membrana predstavlja permeabilnu barijeru odnosno sprječava ulazak molekula koje su velike i hidrofobne, a omogućuje ulazak hidrofilnih molekula (npr.  $\beta$ -laktama). Hidrofilni antibiotici zahvaljujući porinima mogu proći kroz vanjsku membranu i tako dolaze do ciljnog mjesta djelovanja u bakterijskim stanicama, međutim ukoliko dođe do smanjene propusnosti vanjske membrane ti antibiotici neće doći do ciljnog mjesta u bakteriji. Do smanjene propusnosti dolazi zbog promjena, smanjene sinteze ili potpunog gubitka porina (Munita i sur. 2016). Ukoliko je smanjen broj prisutnih porina ili ako je došlo do mutacije koja će promijeniti selektivnost porinskog kanala time dolazi i do smanjene propusnosti antibiotika. Poznato je kako bakterije porodice *Enterobacteriaceae* mogu smanjivati broj porina što dovodi



do rezistencije na karbapeneme. Na ovaj način nastaje rezistencija na tetracikline, aminoglikozide, kloramfenikoline i  $\beta$ -laktamske antibiotike (Reygaert 2018).

#### **1.5.4 Pojačano izbacivanje antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpe**

Pojam efluks podrazumijeva aktivno izbacivanje tvari iz stanice. Kod pojedinih bakterija membranski proteini mogu djelovati kao efluks pumpe za određene skupine antibiotika. Uloga efluks pumpi je izbacivanje antibiotika iz stanice jednakom brzinom kao što oni ulaze u stanicu. Da bi antibiotici bili učinkoviti na bakterijsku stanicu, moraju djelovati dovoljno visokom koncentracijom. Ovakav način izbacivanja antibiotika dovodi do smanjenja stanične koncentracije antibiotika koja nije dovoljna za bakteriostatski ili baktericidni učinak (Gužvinac i sur. 2012). Izbacivanje antibiotika pomoću efluks pumpe zahtjeva utrošak energije kako bi pumpa mogla izbacivati različite skupine antibiotika i tako dovesti do nastanka multiple rezistencije. Međutim, postoje i selektivne efluks pumpe koje izbacuju specifične antibiotike kao npr. tetracikline i makrolide. Kod bakterija porodice *Enterobacteriaceae* glavni mehanizam rezistencije na tetracikline je njihovo aktivno izbacivanje kroz selektivne pumpe (Munita i sur. 2016).

### **1.6 POKRIJEKLO SEKUNDARNE ANTIMIKROBNE REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE**

#### **1.6.1 Kromosomska rezistencija**

Kromosomska rezistencija nastaje kao posljedica spontanijh mutacija koje se događaju na kromosomskom lokusu odgovornom za kontrolu osjetljivosti na određeni antibiotik (Bedenić 2009). Dioba bakterija odvija se brzo, pa stoga uvijek postoji velika mogućnost da će mutacijom nastati stanica koja je rezistentna na antibiotik (Kosalec i sur. 2021). Kromosomske mutacije najčešće dovode do promjene strukture receptora za određeni antibiotik. Također mogu uzrokovati gubitak PBP molekula koje su ciljno mjesto za vezanje  $\beta$ -laktama pri čemu se onemogućuje njihovo vezanje i tako dolazi do rezistencije na njih (Bedenić 2009).

Mutacije mogu dovesti do izražavanja fenotipskih promjena i nastanka mutanta. Antibiotik će djelovati na osjetljive bakterije u populaciji, ali na mutante neće i na taj način dolazi do dominacije rezistentnih bakterija u populaciji (Munita i sur. 2016). Upravo je to razlog zbog kojeg je potreban potpuni tijek liječenja antibiotskom terapijom jer se na takav način uništi velika većina bakterijskih stanica, dok će naša vlastita tjelesna obrana uništiti bilo koju izoliranu preživjelu ili rezistentnu stanicu. Ukoliko tijekom liječenja bude prekinut ranije, tada se naš organizam bori s preživjelim bakterijama. Svaka izolirana

rezistentna bakterijska stanica ima priliku za umnažanjem što kao rezultat daje novu infekciju, ali ovaj put uzročnik infekcije je potpuno rezistentan na antibiotik (Kosalec i sur. 2021).

### 1.6.2 Ekstrakromosomska rezistencija

Kod bakterija se genski materijal često nalazi izvan kromosoma, kao npr. na plazmidima, integronima ili transpozonima i na njima se mogu nalaziti rezistentni geni. Plazmidi mogu nositi gene koji su rezistentni na jedan ili više antibiotika. Ti geni kodiraju sintezu enzima koji mogu mijenjati strukturu antibiotika npr. enzimi  $\beta$ -laktamaze razgrađuju  $\beta$ -laktamski prsten u antibioticima ili pak enzimi koji su odgovorni za modifikaciju aminoglikozida putem fosforilacije ili adenilacije mijenjaju strukturu aminoglikozida te produkti koji nastanu djelovanjem ovih enzima neće imati antibiotsko svojstvo. Na integronima se često nalaze geni koji kodiraju sintezu enzima metalo- $\beta$ -laktamaza koje razgrađuju karbapeneme, ali često sadrže i gene za aminoglikozide (Bedenić 2009).

U obzir treba uzeti i horizontalni prijenos gena koji se odvija različitim mehanizmima, te je to jedan od glavnih pokretača evolucije bakterija, a samim time i prenositelj rezistentnih gena među bakterijskom populacijom (Frieri i sur. 2017). Horizontalni prijenos gena glavni je mehanizam za širenje multiple rezistencije na antibiotike. Pomoću rekombinacije rezistentni geni se mogu inkorporirati u kromosom primatelja. Na Slici 3 su prikazani klasični načini kako bakterije stječu vanjski genetički materijal (Kosalec i sur. 2021):

#### a) Transformacijom

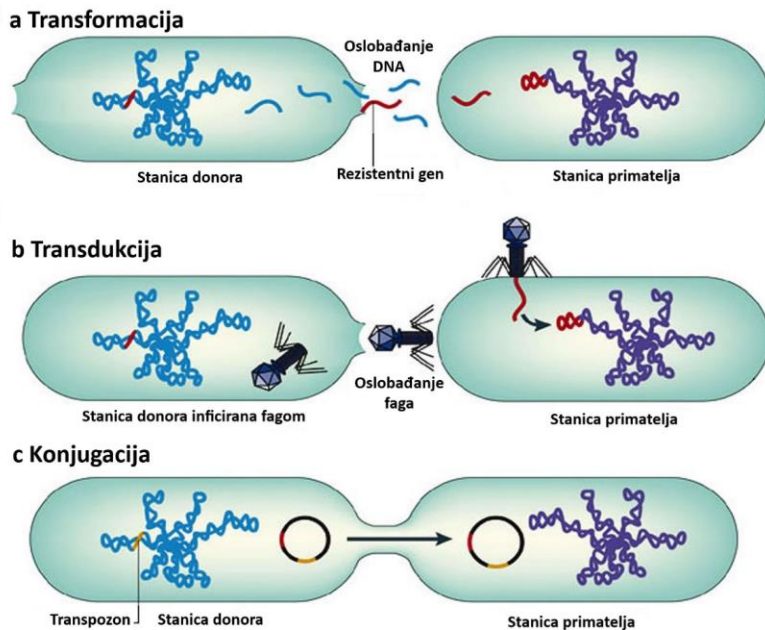
Transformacija je najjednostavniji tip horizontalnog prijenosa gena, ali vrlo je malo kliničkih relevantnih bakterijskih vrsta koje imaju sposobnost „prirodno“ ugraditi golu DNA kako bi razvili rezistenciju.

#### b) Transdukcija

Transdukcija omogućava prijenos malog segmenta informacija. Primjer transdukcije je objašnjiv pomoću plazmida. Plazmidi su male kružne molekule DNA koje pomoću bakteriofaga koji se npr. prethodno nalazio u rezistentnoj stanici, bivaju prenesene u stanicu primatelja koja je osjetljiva. Ukoliko plazmid sadrži rezistentni gen na antibiotike tada će stanica primatelja postati rezistentna na antibiotik.

#### c) Konjugacija

Vrlo učinkovit prijenos gena omogućava konjugacija. To je proces u kojem se ostvaruje kontakt između dvije bakterijske stanice pomoću konjugacijskog mosta kroz koji se izravno prenosi genetički materijal iz jedne stanice u drugu stanicu. Smatra se da je konjugacija jedan od glavnih razloga pojave rezistencije u bolničkom okruženju. Procesom konjugacije često se koriste transporteri tj. mobilni genetički elementi poput plazmida i transpozona kako bi se omogućila razmjena genetičkog materijala.



**Slika 3.** Prikaz horizontalnog načina prijenosa gena: a) transformacija, b) transdukcija, c) konjugacija.

Preuzeto i prilagođeno iz Bbosa i sur. (2014).

### 1.6.3 Unakrsna rezistencija

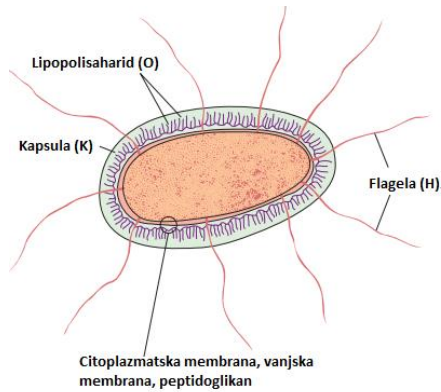
Kada bakterije steknu rezistenciju na određeni antibiotik one mogu biti rezistentne i na druge antibiotike slične strukture i istog mehanizma djelovanja i tada govorimo o unakrsnoj rezistenciji. Razlog unakrsne rezistencije može biti npr. kemijska sličnost antibiotika. Ako su dva antibiotika slične molekularne strukture, ukoliko bakterija postane rezistentna na jedan antibiotik postoji šansa da će biti rezistentna i na drugi. Primjer su tetraciklini gdje unakrsna rezistencija može djelovati na različite skupine te klase antibiotika. Slični mehanizmi djelovanja antibiotika su još jedan od razloga unakrsne rezistencije npr. ako bakterija biva rezistentna na jednu skupinu antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina, moguće je da će biti rezistentna i na druge skupine antibiotike koji također inhibiraju sintezu proteina (Bedenić 2009).

## 1.7 OPĆE KARAKTERISTIKE PORODICE *ENTEROBACTERIACEAE*

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su velika heterogena skupina koja pripada redu *Enterobacterales*. Filogenetski se ubrajaju u podrazredu *Gamaproteobacteriaceae*. Red *Enterobacterales* ima 7 porodica, među kojima je najveća *Enterobacteriaceae* sa više od 60 rodova i 250 vrsta. Taksonomija im je vrlo složena te je u konstantnom razvoju. Klinički značajne *Enterobacteriaceae* obuhvaćaju 20-tak vrsta poput npr. *Escherichia coli* te *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp. (Brooks i sur. 2013; Alnajar i Gupta 2017). Gram negativne su štapičaste bakterije duljine 2-6 µm, a širine 0,5-0,6 µm. Ne stvaraju spore, uglavnom su pokretne pomoću flagela koje su raspoređene peritrihno. Pojedine vrste mogu stvarati kapsulu (Kalenić i sur. 2013). Fakultativni su anaerobi s pozitivnom reakcijom katalaze i negativnom oksidazom. Reduciraju nitrat u nitrite. Otporne su na žučne soli. Dobro rastu na bogatim hranjivim medijima pri 35-37 °C (Whitman i sur. 2015). Prilagodljive su na različite izvore hrane u okolišu te konzumiraju raznolike supstrate poput raznih ugljikohidrata, alkohola, aminokiselina, ali kao glavni izvor energije koriste glukozu dok se pojedine vrste koriste laktozom (Kalenić i sur. 2013).

Mnoge vrste su sveprisutne u različitim ekološkim nišama, kako kopnenim tako i vodenim, dok su pak pojedine povezane samo sa animalnom i humanom mikrobiotom ili biljkama. Prema tome se mogu podijeliti na: (1) ljudske patogene koji su primarno vezani za čovjeka i životinje, komenzali ljudskog i životinjskog probavnog sustava; (2) na biljne patogene koji su usko povezani s biljkama te (3) na endosimbionte koji su povezani s insektima. Iako je riječ o sveprisutnim bakterijama, 1-2% normalne ljudske flore čine *Enterobacteriaceae*. Najčešće se nalaze u gastrointestinalnom traktu, mokraćno-spolnom sustavu, te u vrlo malom broju u gornjem dijelu dišnog sustava. Česti su uzročnici niza infekcija probavnog sustava poput dijareje uzrokovane kontaminiranom hranom i vodom. Uzročnici su infekcija mokraćnog (IMS) i respiratornog sustava, bakterijemije, sepse, meningitisa, apscesa (Farmer i sur. 2010; Kalenić i sur. 2013). Kod IMS-a najčešći uzročnik infekcija je *Escherichia coli*, a kod kompliciranih upala najčešći uzročnici jesu *Klebsiella* spp. i *Proteus* spp. (Andrašević i Tambić-Andrašević 2006).

Imaju složenu antigensku strukturu (Slika 4). Sve vrste *Enterobacteriaceae* imaju somatski O (lipopolisaharidni) antigen. Pokretne vrste imaju flagelarni H proteinski antigen koji se sastoji od proteina flagelina, dok kapsulirane vrste imaju polisaharidni ili proteinski K antigen (Brooks i sur. 2013).



**Slika 4.** Prikaz antigenske strukture *Enterobacteriaceae*.

Preuzeto i prilagođeno iz Brooks i sur. (2013).

Glavni zajednički čimbenici patogenosti bakterija porodice Enterobacteriaceae su endotoksini, ali mogu stvarati i egzotoksine. Infekcije koje uzrokuju mogu biti endogenog ili egzogenog tipa. Endogene infekcije uzrokuju komenzalni probavnog sustava, kao što je npr. *Escherichia coli* čije je prirodno stanište probavni sustav. Pod određenim uvjetima npr. slabljenje imuniteta ili neravnoteža crijevne flore, *Escherichia coli* može migrirati iz probavnog sustava i uzrokovati infekciju. S druge strane, egzogene infekcije nastaju kada se tijelo susreće s patogenima iz vanjskog okruženja, kao npr. konzumacija kontaminirane hrane i vode. Enterobacteriaceae se dijele se na primarne patogene (npr. *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp., pojedini patotipovi *Escherichia coli* i *Klebsiella* sp.) i oportunističke patogene (npr. komenzalni tipovi *Escherichia coli*, određene vrste *Klebsiella*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp., *Morganella* sp.). Primarno patogene bakterije se prenose fekalno-oralnim putem tj. putem kontaminirane vode i hrane, dok oportunističke izazivaju bolesti samo kod osoba sa slabim imunitetom ili ukoliko promjene stanište (Kalenić i sur. 2013).

Zbog svoje patogenosti prema ljudima i životinjama, brzog rasta na definiranom mediju, lakoće genetske manipulacije i sve češće antimikrobne rezistencije, Enterobacteriaceae su postale predmetom intenzivnog laboratorijskog proučavanja. Infekcije koje uzrokuju laboratorijski se poprilično jednostavno dijagnosticiraju, ali prije samog liječenja bitno je izraditi antibiogram budući da je većina vrsta Enterobacteriaceae razvila rezistenciju na razne antibiotike (Rainey i sur. 2015).

Primarno su rezistentne na pojedine skupine antibiotika, te prilikom izbora empirijske terapije tu činjenicu treba uzeti u obzir. Veći i zabrinjavajući problem je sekundarna rezistencija na pojedine skupine antibiotika kao i to da su MDR *Enterobacteriaceae* sve više zastupljene u vanbolničkoj sredini. U medicini prevladava velika zabrinutost zbog sve češće rezistencije *Enterobacteriaceae* na  $\beta$ -laktame, osobito na karbapeneme. Klinički se najviše upotrebljavaju  $\beta$ -laktami jer imaju nisku toksičnost, visoku djelotvornost na infekcije te širok spektar djelovanja (Tambić Andrašević i sur. 2012).

#### 1.7.1 Mehanizmi rezistencije na antibiotike kod *Enterobacteriaceae*

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su razvile rezistenciju na antibiotike putem četiri mehanizma: (1) smanjenjem propusnosti stanične stijenke, (2) mehanizmom pumpe, (3) proizvodnjom enzima te (4) promjenom ciljnog mjesta. Primjerice, rezistencija razvijena putem promjene ciljnog mjesta kod  $\beta$ -laktamskih antibiotika su promjene PBP-a. Kod  $\beta$ -laktama i aminoglikozida najčešće je razvijen mehanizam proizvodnje enzima koji razara antibiotik. Kod tetraciklina najčešće je uočen mehanizam izbacivanja antibiotika iz stanice djelovanjem pumpe. Kada je riječ o mehanizmu smanjene propusnosti stanične stijenke, do propusnosti dolazi zbog gubitka porinskih proteina, ali ovim mehanizmom se ne prekida potpuni unos antibiotika u stanicu već dolazi do smanjenog unosa antibiotika (Andrašević i sur. 2009).

#### 1.7.2 Rezistencija *Enterobacteriaceae* na $\beta$ -laktamske antibiotike

Najraširenija skupina antimikrobnih lijekova su  $\beta$ -laktami. To su polarni hidrofilni spojevi koji prodiru u bakterijske stanice putem porinskih kanala. Na osnovu kemijske strukture dijele se u nekoliko skupina: (1) peniciline; (2) cefalosporine; (3) karbapeneme; (4) monobaktame; (5) inhibitore  $\beta$ -laktamaze. Svima njima je zajednička specifična struktura jezgre koja se sastoji od četverostranog  $\beta$ -laktamskog prstena (Rubtsova i sur. 2010). Djeluju baktericidno inhibirajući sintezu stanične stijenke bakterija. *Enterobacteriaceae* stvaraju rezistenciju na  $\beta$ -laktame pomoću tri mehanizma: (1) onemogućavanjem interakcije između ciljanog PBP-a i antibiotika najčešće modificiranjem sposobnosti antibiotika da se veže na PBP, (2) prisutnost efluksnih pumpi koje mogu istisnuti  $\beta$ -laktame te (3) hidroliziraju antibiotike producirajući enzime  $\beta$ -laktamaze (Reygaer 2018).

Glavni predstavnici  $\beta$ -laktama su:

- a) Penicilini su izolirani iz filtrata kulture gljiva *Penicillium notatum* i *Penicillium chrysogenum*. Temeljna strukturna komponenta je kemijski nestabilna 6-aminopenicilanska kiselina koja sadrži dva prstena, peteročlani tiazolidinski prsten i četveročlani  $\beta$ -laktamski prsten. Prstenovi su ključni za antibiotska svojstva. Djelovanjem  $\beta$ -laktamaza (penicilaza), prsten lako podliježe razgradnji.

Commented [NN1]: Opet siva pozadina...molim dobro pregledati cijeli rad i maknuti sivu pozadinu

Cijepanjem  $\beta$ -laktamskog prstena nastaje penicilinska kiselina koja nema antibiotsko svojstvo. 6-aminopenicilinska kiselina je ishodišna tvar za dobivanje polusintetskih penicilina. Penicilini su podijeljeni u tri osnovne skupine. Neki od penicilina su dalje podijeljeni u podskupine koje se međusobno razlikuju, uglavnom po svom antimikrobnom spektru djelovanja:

- penicilini s uskim spektrom djelovanja: penicilin G, penicilin V, prokain-penicilin G i benzatin-penicilin G
- antistafilokokni penicilini djelotvorni protiv stafilokoka koji produciraju  $\beta$ -laktamaze: nafcilin, kloksacilin, dikloksacilin i flukoksacilin
- penicilini proširenog spektra djelotvorni protiv Gram-negativnih mikroorganizama: aminopenicilini (ampicilin i amoksicilin), karboksipenicilini, ureidopenicilini (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010; Solomun i sur. 2011).

b) Cefalosporini su antibiotici izolirani iz filtrata kulture aktinomiceta poznatog kao *Cephalosporium acremonium* (kasnije *Acremonium chrysogenum*). Osnovna struktura cefalosporina sastoji se od 7-aminocefalosporanske kiseline koja ima sličnost s 6-aminopenicilanskom kiselinom. Kemijskom strukturom i mehanizmom djelovanja slični penicilinima, ali za razliku od njih otporniji su na  $\beta$ -laktamaze i imaju izrazito širok spektar djelovanja. Podijeljeni su u četiri generacije, svaka od njih ima širi raspon djelovanja u odnosu na prethodnu generaciju:

- u I. generaciju spadaju cefapirin, cefalotin, cefazolin, cefaleksin i cefadroksil, koji su djelotvorni protiv Gram pozitivnih koka, ali pokazuju učinkovitost protiv *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*.
- u II. generaciju spadaju: cefuroksim, cefoksitin, cefaklor i cefamandol. Učinkoviti su protiv istih uzročnika kao i predstavnici I. generacije, ali su otporniji na  $\beta$ -laktamaze Gram negativnih bakterija.
- u III. generaciju spadaju: cefoperazon, cefotaksim, ceftazidim i cefriakson, koji su slabije aktivni protiv Gram pozitivnih koka od predstavnika I. generacije, ali su mnogo učinkovitiji protiv Gram negativnih bakterija.
- u IV. generaciju spadaju: cefepim, cefpirom i cefkvinom. Otporni su na  $\beta$ -laktamaze i neučinkoviti na *P. aeruginosa* (Solomun i sur. 2011).

c) Karbapenemi su antibiotici širokog spektra djelovanja. Djeluju na Gram pozitivne i negativne bakterije. Izrazito su djelotvorni na hidrolitičko djelovanje enzima ESBL i  $\beta$ -laktamaza AmpC te se zbog toga smatraju prvom linijom obrane u borbi s infekcijama čiji je patogen rezistentan na većinu antibiotika. Prvi otkriveni karbapenem jest tienamicin. Budući da je bio podložan alkalnoj hidrolizi

i nestabilno se ponašao u vodenim otopinama, nije uveden u kliničku upotrebu. Prvi karbapenem koji se koristio u kliničkom liječenju je imipenem. Uz njega danas se još koriste i meropenem, ertapenem i doripenem. Kako bi ostvarili svoje antibiotsko djelovanje moraju doći do periplazmatskog prostora gdje se događa sinteza peptidoglikana. Antimikrobno djelovanje ostvaraju vezivanjem na različite PBP stanične stijenke te tako onemogućuju sintezu peptidoglikana što rezultira lizom bakterijske stanice. Od svih  $\beta$ -laktama imaju najbolje antibiotsko djelovanje na Gram negativne bakterije. U odnosu na ostale  $\beta$ -laktame, stabilni su prema većini  $\beta$ -laktamaza, izuzev karbapenemaza, enzima koji ih razaraju. Razlog tomu jest njihova specifična stereokemija postraničnog lanca (Bubonja-Šonje i Abram 2014). Zbog svoje strukture ne mogu slobodno difundirati kroz vanjsku membranu, ali njihov prolazak je omogućen kroz porinske kanale. Razlozi zbog kojeg imaju širok spektar aktivnosti u odnosu na druge  $\beta$ -laktame jest što mogu lako proći kroz porinske kanale, imaju visok afinitet vezanja za PBP i vrlo su neosjetljivi na hidrolizu enzima  $\beta$ -laktamaza AmpC i ESBL (Papp-Wallace i sur. 2011).

- d) Monobaktami su antibiotici s monocikličkim  $\beta$ -laktamskim prstenom. Djelotvorni su protiv aerobnih Gram negativnih štapićastih bakterija. Strukturno su slični cefalosporinima III. generacije. Rezistentni su na većinu  $\beta$ -laktamaza, osim na AmpC  $\beta$ -laktamaze i  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra. Aztreonam je jedini monobaktam koji se koristi u kliničkoj primjeni (Bedenić 2009).
- e) Inhibitori  $\beta$ -laktamaza također sadrže  $\beta$ -laktamski prsten, ali oni imaju slabu antibiotsku aktivnost. Učinkovito suzbijaju djelovanje  $\beta$ -laktamaza, proširujući antimikrobni spektar određenih  $\beta$ -laktama na bakterije koje proizvode  $\beta$ -laktamaze. Djeluju protiv  $\beta$ -laktamaza tipa A, kao što su penicilinaze i ESBL laktamaze, dok ne djeluju na tip B metalo- $\beta$ -laktamaze, te tipove C i D. U kliničkoj praksi koriste se tri inhibitora  $\beta$ -laktamaza: klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam, ali uvijek u kombinaciji s odgovarajućim  $\beta$ -laktamskim antibiotikom kao npr. kombinacije klavulanske kiseline s amoksicilinom (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010).

### 1.7.3 $\beta$ -laktamaze i njihova klasifikacija

Proizvodnja  $\beta$ -laktamaza je najčešći mehanizam rezistencije koji koriste Gram negativne bakterije na  $\beta$ -laktame i najvažniji mehanizam rezistencije na peniciline i cefalosporine (Reygaer 2018). Enzimi se ciljano vežu za mjesto djelovanja penicilina tj. za PBP s kojim onda čine homolognu sekvencu što dovodi do inaktiviranja penicilina. U većini slučajeva  $\beta$ -laktamaze djeluju tako da se serinsko aktivno mjesto enzima nekovalentno veže s antibiotikom stvarajući pri tome tzv. Michelisov kompleks. Nakon toga, hidroksilna skupina aktivnog serinskog mjesta enzima veže se za  $\beta$ -laktamski prsten antibiotika, što rezultira stvaranjem kovalentnog kiselog estera te se hidrolizom estera oslobađa aktivni enzim i neaktivan



antibiotik (Samaha-Kfoury i Aray 2003). Za razliku od Gram pozitivnih bakterija kod kojih su  $\beta$ -laktamaze smještene većinom s vanjske strane stanične stijene tj. ekstracelularno ili su adherirane za citoplazmatsku membranu, kod Gram negativnih bakterija se nalaze u vrlo malim količinama u periplazmatskom prostoru (između citoplazmatske membrane i stanične stijenske) i napadaju antibiotik prije no što on dođe do ciljnog mjesta (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010). Enzimi mogu biti urođeno kodirani na bakterijskom kromosomu ili mogu biti stečeni putem plazmida. Mnogi članovi porodice Enterobacteriaceae posjeduju kromosomski kodirane  $\beta$ -laktamaze (Reygaer 2018), koje mogu biti konstitutivne i inducibilne. Inducibilne se stvaraju samo prilikom izlaganja bakterija  $\beta$ -laktamima (Sabate i sur. 2002), dok kod konstitutivnih nije potrebno prisustvo  $\beta$ -laktama da bi nastale već se stalno stvaraju (Bedenić 2004). Velik broj rodova Gram negativnih bakterija ima kromosomski kodirane  $\beta$ -laktamaze. Pretpostavlja se da je razlog tomu najvjerojatnije selektivni pritisak  $\beta$ -laktamskih antibiotika kojeg luče okolišni mikroorganizmi (Samaha-Kfoury i Aray 2003).  $\beta$  laktamaze kodirane na mobilnim genetskim elementima, plazmidima ili transpozonomima se mogu prenositi između različitih vrsta i rodova jer nisu specifične za vrstu kao kromosomske (Bradford 2001).

Ubrzo nakon uvođenja penicilina u kliničku primjenu opisane su i prve  $\beta$ -laktamaze. Prva otkrivena  $\beta$ -laktamaza koja je kromosomski kodirana genom *AmpC* (nazvanom po rezistenciji na ampicilin) izolirana je iz bakterije *Escherichia coli*. *AmpC*  $\beta$ -laktamaze najučinkovitije su protiv penicilina i nekih cefalosporina I. generacije (Reygaer 2018). Kasnije je otkrivena prva  $\beta$ -laktamaza kodirana na plazmidu i nazvana je TEM-1 (Datta i Kontomichalou 1965), te su kasnije otkrivene i druge plazmidno kodirane  $\beta$ -laktamaze kao što su TEM-2, SHV-1, SHV-2 i brojne druge (Bradford 2001).

Klasifikacija  $\beta$ -laktamaza je jako problematična i otežavajuća. Trenutačno su u praksi dvije klasifikacije. Jedna je temeljena na funkcionalnim obilježjima (npr. supstratni profil, osjetljivost enzima na inhibitore, molekularna težina, izoelektrična točka i dr.) i naziva se klasifikacija po Bush-u i suradnicima. Druga klasifikacija se temelji na molekularnim obilježjima tj. temeljena je na osnovu određivanja slijeda aminokiselina i nukleotida u enzimu i nazvana je klasifikacija po Ambleru. Obje vrste klasifikacije dijele  $\beta$ -laktamaze u četiri skupine. Klasifikacija po Bush-u  $\beta$ -laktamaze dijele u grupe od 1 do 4, a prema Ambleru označene su slovima od A do D. A, C i D  $\beta$ -laktamaze vrste su PBP-a, imaju malu molekularnu masu, ne sudjeluju u sintezi stanične stijenske i evolucijski su različite serinske  $\beta$ -laktamaze.  $\beta$ -laktamaze tipa B tzv. metalo-  $\beta$ -laktamaze strukturno su različite od PBP-a. Budući da  $\beta$ -laktamaze imaju sposobnost specifično inaktivirati određenu skupinu  $\beta$ -laktama prema tome se specifično dijele na: penicilinaze, cefalosporinaze

i karbapenemaze. Klinički najznačajnije su  $\beta$ -laktamaze tipa A i C, dok su tipa B one koje mogu hidrolizirati sve  $\beta$ -laktame izuzev monobaktama (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010; Samaha-Kfoury i Ara 2003).

### **1.8 REZISTENCIJA ENTEROBACTERIACEAE NA KARBAPENEME**

Zbog porasta infekcija čiji su uzročnici *Enterobacteriaceae* koje produciraju ESBL enzime sve više se upotrebljavaju antibiotici posljednje linije obrane. Zbog toga je u kliničku upotrebu bilo potrebno uvesti karbapeneme koji će djelovati na njih (Andrašević i sur. 2009). 1990-tih otkrivene su prve kromosomske karbapenemaze kod *Enterobacteriaceae*. Nedugo od toga u SAD-u su otkriveni izolati *Klebsiella pneumoniae* koji su imali karbapenemaze kodirane na plazmidima. U usporedbi s drugim antibioticima, rezistencija na karbapeneme je uglavnom postala sporadična, sve dok se nisu krenuli pojavljivati MDR bakterije koje produciraju plazmidne karbapenemaze. Rezistencija *Enterobacteriaceae* na sve karbapeneme relativno je niska, no u stalnom je porastu. *Enterobacteriaceae* su najčešće rezistentne na ertapenem jer je on najpodložniji hidrolizi ESBL-a ili enzimima *AmpC* što uz smanjenu propusnost vanjske membrane rezultira rezistencijom (Bubonja-Šonje i Abram 2014). Kod Gram negativnih bakterija rezistencija na karbapeneme nije posredovana samo produkcijom enzima karbapenemaza već može nastati i na druge načine npr. smanjenom propusnošću vanjske membrane zbog gubitka ili promjene porina te pojačanim izbacivanjem karbapenema putem efluks pumpe iz stanice ili kombinacijom navedenih mehanizama.

Bakterije koje produciraju karbapenemaze pokazuju širok raspon rezistentnih fenotipova što prije svega ovisi o razini ekspresije, osobinama enzima kao i prisutnosti dugih mehanizama rezistencije. Infekcije uzrokovane bakterijama koje produciraju karbapenemaze imaju visoku stopu mortaliteta. Takve bakterije se nazivaju „superbakterijama“. Pred kliničarima su mnogobrojni problemi prilikom liječenja infekcija uzrokovanih „superbakterijama“ jer je sužen izbor antibiotika koji će biti djelotvorni, ali ih muči i manjak podataka o samoj djelotvornosti antimikrobne terapije. Izbor djelotvornih antibiotika je često ograničen na polimiksine (kolistin, polimiksin B) i tigeciklin. Istraživanja pokazuju da je učinkovitija kombinirana primjena dvaju djelotvornih antibiotika nego li primjena monoterapije (Bubonja-Šonje i Abram 2014). Rezistencija na karbapeneme kod bakterija koje ne produciraju karbapenemaze je uglavnom nestabilna i može spontano nestati zbog negativnog utjecaja smanjene propusnosti stijenke na preživljavanje mutanta te zbog nemogućnosti širenja gena horizontalnim prijenosom. Kod bakterija koje produciraju karbapenemaze smanjena propusnost stijenke će dovesti i do smanjene osjetljivosti na ostale klase antibiotika (Tambić Andrašević i sur. 2012).

### 1.8.1 Tipovi i klasifikacija karbapenemaza

Prema Amblerovoj molekularnoj klasifikaciji karbapenemaze se dijele na razrede A, B i D. Isprva su karbapenemaze bile pronađene samo kod nefermentirajućih bakterija, ali sve češćom upotrebom karbapenema s vremenom je kod *Enterobacteriaceae* osobito kod *Klebsiella pneumoniae* zabilježen sve veći broj karbapenemaza. Od svih karbapenemaza metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL) razreda B pokazuju najviši stupanj rezistencija na karbapeneme (Bubonja-Šonje i Abram 2014).

Karbapenemaze molekularnog razreda A su serinske. Mogu hidrolizirati širok spektar  $\beta$ -laktama: peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aztreonam. Inhibira ih klavulanska kiselina i tazobaktam. Geni za karbapenemaze se mogu nalaziti na kromosomu ili plazmidu. Velik broj karbapenemaza razreda A pronađen je isključivo kod *Enterobacteriaceae*. Karbapenemazama molekularnog razreda A pripadaju sljedeći članovi SME (eng. *Serratia marcescens* enzyme), KPC (eng. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NmcA/IMI (eng. not metalloenzyme carbapenemase/imipeneme-hydrolysing  $\beta$ -lactamase), GES (eng. Guiana extended-spectrum  $\beta$ -lactamase), SHV-38 (eng. sulfhydryl variable  $\beta$ -lactamase) i SFC-1 (eng. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Serratia fonticola*) (Bubonja-Šonje i Abram 2014). Najznačajnija klinički i epidemiološki jest KPC karbapenemaza. KPC enzimi manje su osjetljivi ili pak potpuno rezistentni na sve  $\beta$ -laktame. Zabrinjavajuće jest da sve veći broj europskih zemalja prijavljuje naglu zastupljenost KPC izolata. Tijekom 2011. godine, u Hrvatskoj je zabilježena prva izolacija KPC karbapenemaze. Do 2013. godine, broj izoliranih KPC karbapenemaza porastao je na 33. Budući da se izolati KPC u Hrvatskoj brzo rasprostranjuju, Hrvatska se ubraja u zemlje četvrtog stupnja širenja epidemije navedenim izolatom (Bubonja-Šonje i Abram 2014).

Karbapenemaze razreda B su MBL. Kod njih se u aktivnom mjestu enzima nalazi cink. Mogu hidrolizirati sve peniciline, karbapeneme i cefalosporine, ali ne hidroliziraju aztreonam. Ne inhibiraju ih klasični inhibitori  $\beta$ -laktamaza. Budući da se u aktivnom mjestu enzima nalazi cink koji je bitan za katalitičko djelovanje karbapenemaza molekularnog razreda B, zajedničko svojstvo svih MBL jest da ih inhibiraju kelatori metalnih iona poput EDTA ili merkaptopropionska kiselina (Bubonja-Šonje i Abram 2014). Najvažniji članovi su: NDM (eng. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase), VIM (eng. Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase), IMP (eng. imipenemase), SPM (eng. Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase), SIM (eng. Seoul imipenemase), GIM (eng. German imipenemase), AIM (eng. Adelaide imipenemase), DIM (eng. Dutch imipenemase), KHM (*Citrobacter freundii* stain KHM243- Kyorin Hospital MBL), SMB (eng. *Serratia metallo- $\beta$ -lactamase*), TMB (eng. Tripoli metallo- $\beta$ -lactamase) i FIM (eng. Florence imipenemase). Opisani enzimi

su pronađeni u izolatima *Enterobacteriaceae*. Geni za karbapenemaze MBL nalaze se na mobilnim genetskim elementima kao što su npr. integroni. Integroni mogu imati i druge gene kao što su npr. rezistentni gen na ostale grupe antibiotika i kada se integroni udruže s plazmidima ili transpozonomima može doći do prijenosa tih gena među bakterijama. Upravo na takav način nastaju bolničke epidemije koje je teško suzbiti (Bedenić i sur. 2015).

Karbapenemaze molekularnog razreda D čine oksacilinaze (eng. oxacillinase, OXA). Hidroliziraju karbapeneme, ali i druge  $\beta$ -laktame te su uglavnom slabo inhibirane kiselinom. OXA karbapenemaze su rezistentne tek kada su u kombinaciji s nekim drugim mehanizmom rezistencije poput npr. efluks pumpa. Najviše su izolirane iz nefermentirajućih bakterija, manjim dijelom kod *Enterobacteriaceae*. Kod *Enterobacteriaceae* je najčešće izolirana OXA-48  $\beta$ -laktamaza (Bedenić i sur. 2014). Karbapenemaze razreda D mogu imati različiti antimikrobnu aktivnost što ovisi o izolatu u kojem se nalaze. Primjerice, ukoliko su prisutni u *Escherichia coli* ponašaju se kao  $\beta$ -laktamaze uskog spektra, no kada su prisutni u *A. baumannii* ponašaju se kao karbapenemaze s visokom stopom otpornosti na karbapeneme (Goosens i Grabein 2005).

### **1.9 ESBL IZOLATI PORODICE ENTEROBACTERIACAE**

Najveći problem u kliničkoj praksi predstavljaju *Enterobacteriaceae* koje su rezistentne na cefalosporine III. generacije. One proizvode ESBL tj.  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (Rubtsova i sur. 2010). ESBL su enzimi nastali točkastom mutacijom tj. supstitucijom aminokiselina iz enzima TEM-1, TEM-2 i SHV-1 (Matthew 1979). 1980-tih godina su otkriveni prvi ESBL izolati. Opisani su kod svih vrsta porodice *Enterobacteriaceae*, ali najčešće se nalaze kod *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* (Samaha-Kfoury i Araj 2003). Budući da je gen za ESBL većinom smješten na plazmidima, ESBL izolati se vrlo brzo rasprostranjuju pa je epidemija ESBL-om zastupljena i u bolničkoj i vanbolničkoj sredini (Andrašević i sur. 2009). Dijagnostika ESBL-a je otežavajuća, pa samim tim pacijent može dobiti neadekvatnu terapiju što onda rezultira produljenim liječenjem ili smrću. Standardne laboratorijske metode određivanja prirode uzročnika zarazne bolesti i otkrivanja rezistencije na antibiotike temelje se na fenotipskim karakteristikama mikrobnih uzročnika. U najboljem slučaju, fenotipske metode detekcije ESBL-a omogućuju utvrđivanje prisutnosti enzima, ali ne mogu dati informacije o točno kojem enzimu se radi (Rubtsova i sur. 2010).

Bakterije koje produciraju ESBL enzime mogu hidrolizirati sve  $\beta$ -laktame osim karbapenema tj. hidroliziraju starije cefalosporine, cefalosporine proširenog spektra (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson), peniciline i monobaktame, onemogućujući antimikrobno djelovanje antibiotika (Thomson 2001). Pokazuju

osjetljivost na inhibitore  $\beta$ -laktamaza (Gniadkowski 2001). Prijetnju djelotvornosti  $\beta$ -laktamskih antibiotika predstavlja činjenica pojavnosti za sad rijetkih TEM- $\beta$ -laktamaza rezistentnih na klavulansku kiselinu (Andrašević i sur. 2009).

Prema molekularnoj klasifikaciji ESBL izolati spadaju u klasu A ili D  $\beta$ -laktamaza. Prema funkcionalnoj klasifikaciji pripadaju podskupini 2be koja uključuje uglavnom bakterije ESBL koje su proizašle iz TEM i SHV enzima i podskupini 2d kojoj pripadaju enzimi koji su derivati OXA enzima (Livermore 1995). Bakterije koje luče ESBL tipični su primjer MDR bakterija jer su geni odgovorni i za druge mehanizme rezistencije smješteni na istom plazmidu kao i ESBL gen te se tako zajedno prenose (Pitout i sur. 2005). Pomoću molekularnih metoda, na osnovu aminokiselinskih sekvenci otkriveno je više od 300 različitih ESBL enzima koji su svrstanih u 9 porodica (Apisarnthanarak i sur. 2008).

ESBL se dijele u tri skupine: derivate TEM, SHV i CTX-M- $\beta$ -laktamaze. Skupina TEM sadrži više od 130 enzima ESBL, dok skupine SHV i CTX-M sadrže više od 50 enzima ESBL (Bradford 2001).

- TEM  $\beta$ -laktamaze su plazmidno kodirani tipovi  $\beta$ -laktamaza koje su najčešće zastupljene kod Gram negativnih bakterija. Derivati su enzima TEM-1 i TEM-2 (Jacoby i Munoz-Price 2005). Produkcija TEM-1 enzima je odgovorna za gotovo 90% rezistencija *Escherichia coli* na ampicilin. TEM-1 može hidrolizirati peniciline i starije cefalosporine. Nakon samo jedne točkaste mutacije aminokiseline nastala je prva mutanta od TEM-1 tj. TEM-2 (Sabate i sur. 2002).
- SHV  $\beta$ -laktamaze (eng. sulfhydryl variable  $\beta$ -lactamase) su kromosomski kodirane i prisutne su kod svih sojeva *Klebsiella pneumoniae* te su odgovorne za njihovu primarnu rezistenciju na ampicilin. SHV  $\beta$ -laktamaze se zabilježene i kod *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus* i *P. aeruginosa*, ali su one kod njih kodirane plazmidno (Paterson i sur. 2003). Za razliku od TEM  $\beta$ -laktamaza, SHV-1 ima manje i nisu toliko raznolike (Sabate i sur. 2002).
- CTX-M  $\beta$ -laktamaze (eng. Cefotaximase-Munich extended spectrum  $\beta$ -lactamase) su novije vrste ESBL enzima plazmidno kodirani. Prema molekularnoj klasifikaciji pripadaju grupi A, a prema funkcionalnoj klasifikaciji pripadaju podgrupi 2be (Sabate i sur. 2002). Potekli su od kromosomskih *AmpC*  $\beta$ -laktamaza bakterijske vrste *Klyvera ascorbata* i *K. georgiana* putem horizontalnog prijenosa gena. Najčešće su prisutni u izolatima *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Rijetko se mogu naći kod drugih vrsta porodice *Enterobacteriaceae* (Bradford 2001). Ova skupina  $\beta$ -laktamaza ima oko 30-ak enzima (Bonnet 2004).

## **1.10 ORGANIZACIJE KOJE SE U HRVATSKOJ BAVE PRAĆENJEM REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE I NJIHOVOM POTROŠNJOM**

Od same primjene penicilina AMR je uzela maha u Europi i globalno. SZO i EU izdaju brojne preporuke za racionalizaciju potrošnje antibiotika i očuvanje njihove djelotvornosti, kao i osnivanje raznih organizacija u svrhu smanjenja stope rezistencije (Payerl-Pal 2009). Već od 1996. godine zdravstveni djelatnici i znanstvenici u Hrvatskoj su uočili bojaznost od češće zastupljenosti MDR bakterija, te je tako u Hrvatskoj započeto sustavno praćenje rezistencije na antibiotike. Te godine pri Kolegiju javnog zdravstva Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) osnovan je Odbor za praćenje rezistencije na bakterije u čijem radu sudjeluju gotovo svi mikrobiološki laboratoriji u Hrvatskoj. Odbor je 1997. godine prihvatio američke Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), a 2011. godine europske The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standarde kao službene nacionalne standarde glede testiranja osjetljivosti na antibiotike (Kosalec i sur. 2021). 2003. godine Odbor je proširio svoje djelovanje praćenjem potrošnje antibiotika u bolnicama te je osnovana Alliance for the prudent use of antibiotics (APUA Croatia) koju uglavnom čine članovi Odbora. Osnovna aktivnost APUA je prikupljanje podataka o potrošnji antibiotika u bolnicama (Payerl-Pal 2009). Na Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ 2003. godine osnovan je Referentni centar Ministarstva zdravstva za praćenje rezistencije bakterija (Kosalec i sur. 2021).

Krajem 1990-tih na europskoj razini pokrenuto je praćenje rezistencije bakterija i potrošnje antibiotika kroz projekte Europskog sustava za nadzor antimikrobne rezistencije (EARSS) i Europskog nadzora potrošnje antimikrobnih sredstava (EASC), kojima se priključila i Hrvatska. Budući da su EARSS i ESAC bila dva najuspješnija europska projekta, godine 2010. i 2011. prerasli su u Europsku mrežu za nadzor antimikrobne rezistencije (EARS-Net) i Europsku mrežu za nadzor potrošnje antimikrobnih sredstava (EASC-Net). Sudjelovanje u ova dva programa omogućava pregled podataka o rezistenciji bakterija u zemljama EU. Prema preporukama EU u Hrvatskoj je 2006. godine pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske osnovana Interdisciplinarna sekcija za kontrolu i rezistenciju na antibiotike (ISKRA). ISKRA koordinira sve aktivnosti koje su vezane uz kontrolu rasprostranjenja rezistencije na antibiotike u području humane medicine, veterine, ali i surađuje s istovjetnim tijelima drugih europskih zemalja. Glavne aktivnosti kojima se bavi je kontinuirano praćenje rezistencije i potrošnje antibiotika, razvijanje smjernica za racionalno korištenje antibiotika, edukacije zdravstvenih djelatnika kao i provođenje javnih kampanja kako bi se podigla svijest o antibioticima i rezistenciji (Kosalec i sur. 2021).

### 1.11 REZISTENTNI IZOLATI U VANBOLNIČKOJ I BOLNIČKOJ POPULACIJI

Više od 90% antibiotika se koristi za vanbolničko liječenje, ali najizazovnija situacija glede rezistencije na antibiotike je u bolničkom okruženju. Tamo je upotreba antibiotika za terapijske svrhe vrlo česta, stvaraju se savršeni uvjeti za povećanje rezistencije i proliferaciju MDR bakterija (Kosalec i sur. 2021).

Poznata nam je činjenica da u bolničkim sredinama cirkuliraju MDR bakterijski izolati, ali danas je postala goruća tema njihove pojavnosti u vanbolničkoj sredini. Bakterije rezistentne na antibiotike su sve više prisutne u kanalizaciji, vodi i hrani. Prevelika upotreba antibiotika uzrokuje stalni porast rezistencije zbog čega se dovodi u pitanje ugroženost učinkovitosti empirijske antibiotske terapije (Kosalec i sur. 2021).

IMS je najčešća infekcija koju uzrokuju *Enterobacteriaceae* u vanbolničkoj i bolničkoj sredini. Kod vanbolničke populacije najčešći uzročnik IMS-a je *Escherichia coli*, pa shodno tome vrlo je važno uspjeti očuvati njenu dobru osjetljivost na antibiotike (Kosalec i sur. 2021). Od početka praćenja rezistencija u Hrvatskoj i EU ubrzo se detektirala visoka stopa rezistencije *Escherichia coli* na ampicilin i ko-trimoksazol. U brojnim europskim zemljama i SAD-u utvrđena je rezistencija na ko-trimoksazol u više od 20% izolata *Escherichia coli*, ali kod ostalih *Enterobacteriaceae* ta je stopa još i viša (Andrašević i Tambić 2006). Zbog visoke rezistencija, ko-trimoksazol i ampicilin dugi niz godina nisu izbor za empirijsko liječenje IMS-a (Kosalec i sur. 2021). Prvi penicilinski antibiotik koji je djelovao na Gram negativne bakterije bio je amoksicilin, te je on nazvan penicilinom širokog spektra (Andrašević i Tambić 2006). Sve je češća pojava rezistencija na ampicilin koja je uzrokovana ESBL laktamazama (Kosalec i sur. 2021). U Hrvatskoj je danas 50% *Escherichia coli* i 30% *Proteus mirabilis* rezistentno na ampicilin (Andrašević i Tambić Andrašević 2006).

Krajem 1980-tih kod *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* uočena je rezistencija na cefalosporine II. i III. generacije uzrokovana djelovanjem enzima ESBL (Kosalec i sur. 2021). ESBL razara sve  $\beta$ -laktame osim karbapenema (Andrašević i Tambić Andrašević 2006). Uspoređujući rezistenciju na cefalosporine između drugih europskih zemalja i Hrvatske, Hrvatska spada u zemlje sa srednje visokim stopama rezistencije na cefalosporine. Rezistencija iznosi 10-25% (Kosalec i sur. 2021). Udio izolata *Escherichia coli* koji produciraju ESBL u Hrvatskoj je 2% i ti izolati su često vidljivi u vanbolničkoj populaciji. U Hrvatskoj udio ESBL izolata *Klebsiella pneumoniae* u bolničkoj sredini je između 20-40% (Andrašević i Tambić Andrašević 2006).

U europskim zemljama zabilježen je stalni porast rezistencije *Escherichia coli* na kinolone, a u šest europskih zemalja rezistencija na fluorokinolone premašuje 25%. Kinoli su u Hrvatskoj postali okosnica za liječenje IMS-a, međutim zabilježen je blagi, ali konstantni porast rezistencije, gdje je rezistencija *Escherichia coli* na kinolone dostigla 10% (Andrašević i Tambić Andrašević 2006). Uspješno djelovanje protiv enzima ESBL pruža klavulanska kiselina. Djelotvornost amoksicilinu vraća kombinacija s klavulonskom kiselinom, ali i onemogućava upotrebu amoksicilina u visokim dozama koje često bivaju potrebne kod liječenja ozbiljnih sistemskih infekcija pa se tako osjetljivost na amoksicilin s klavulanskom kiselinom dvostruko interpretira (Kosalec i sur. 2021).

Upotreba gentamicina kod liječenja IMS-a nije dovela do visoke stope rezistencije. U Hrvatskoj rezistencija *Escherichia coli* na gentamicin iznosi 6%, dok je rezistencija na netilmicin i amikacin 1%. Zbog uskog spektra djelovanja, kao i zbog niske stope rezistencije kod nekomplikiranog cistitisa koriste se fosfomicin i furantoin (Kosalec i sur. 2021). Što se tiče nitrofurantoina, rezistencija u *Escherichia coli* sporo se razvija i iznosi 3%. Fluorokinoloni pokazuju dobru učinkovitost s niskim MIK-om za *Enterobacteriaceae* (Andrašević i Tambić Andrašević 2006).

Osim *Escherichia coli*, uzročnici IMS-a kod bolničke populacije su i druge Gram negativne bakterije kao npr. *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., te nefermentirajuće bakterije *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. (Andrašević i Tambić Andrašević 2006). U hrvatskim bolnicama najveći problem predstavljaju *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, a zadnjih godina i *Klebsiella pneumoniae* koji su sve više rezistentni na karbapeneme. Rezistencija na karbapenemske antibiotike proširila se diljem svijeta. U pojedinim zemljama karbapenemi nemaju učinkovito djelovanje na više od polovice pacijenata koji bivaju liječeni od infekcija uzrokovanih *Klebsiella pneumoniae*. Najčešći enzimi koji uzrokuju rezistenciju na karbapeneme kod *Enterobacteriaceae*, osobito kod *Klebsiella pneumoniae* su KPC, NDM, VIM te OXA-48 enzimi. Ozbiljnu prijetnju u budućnosti, osobito kod uroloških bolesnika i infekcija koje su povezane s bolničkom skrbi predstavlja *Proteus mirabilis* koji je prirodno rezistentan na kolistin, tigeciklin te pokazuje nisku osjetljivost na imipenem (Kosalec i sur. 2021). Posebnu zabrinutost predstavlja rezistencija na kolistin, koji se koristi kao zadnja linija obrane u liječenju infekcija uzrokovanih Gram negativnim bakterijama koje su rezistentne na sve ostale antibiotike (Kosalec i sur. 2021). Alarmantno stanje glede kolistin-rezistentnih izolata bilo je 2019. godine u hrvatskim bolnicama. Tada je uočena rasprostranjenost kolistin-rezistentnog izolata *Klebsiella pneumoniae* ESBL OXA-48 u nekoliko bolnica u različitim regijama Hrvatske, ali je uočena sve češća zastupljenost navedenog izolata i kod vanbolničke populacije (Tot i sur. 2021).



*Enterobacteriaceae* rezistentne na cefalosporine III. generacije, *Pseudomonas* rezistentan na karbapeneme, te MRSA su bakterije koje dominiraju u bolničkoj flori i uzrokuju teške zdravstvene probleme. MRSA i *Escherichia coli* koje produciraju ESBL uzrokuju infekcije i kod pacijenata izvan bolnice protiv kojih većina antibiotika pokazuje neučinkovitost (Tambić Andrašević 2007).

### 1.12 REZERVOARI REZISTENTNIH BAKTERIJA I GENA ZA REZISTENCIJU

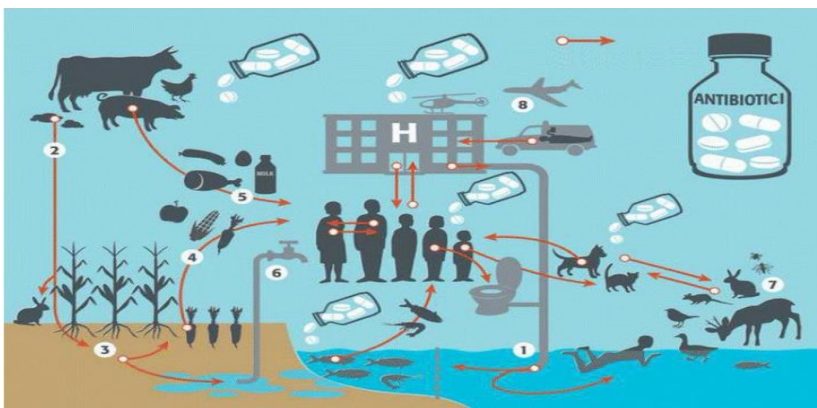
SZO za cilj ima nadzor nad rezistencijom u svim sektorima pa tako i u okolišu. Zbog masivne, ali često i neadekvatne upotrebe antibiotika u humanoj medicini, veterini, akvakulturi, poljoprivredi i industrijskom uzgoju životinja velik broj antibiotika završava u okolišu. Antibiotici mogu dospjeti u okoliš na različite načine (Slika 5), no najučestaliji izvor su otpadne vode. One su jedan od ključnih rezervoara MDR bakterija kao i antimikrobnih lijekova koji se ne metaboliziraju u potpunosti u ljudskom ili životinjskom organizmu, te se 30-90% izlučuju iz organizma u okoliš. Otpadne vode se smatraju sekundarnim staništem vanbolničkih MDR bakterija kao i rezistentnih gena. U njima se najčešće identificiraju MDR bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, posebice *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., ali i *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp. i *Enterococcus* spp. Otpadne vode, osobito netretirane bolničke i farmaceutske, su okolišni spremnik koji pridonosi pojavi i rasprostranjenju MDR bakterija. 46,4% bakterija iz kanalizacijskih postrojenja, bolnica i farmaceutskih tvornica je MDR (Bbosa i sur. 2014). Nepročišćene otpadne vode sadrže antimikrobne lijekove, dezinfekcijska sredstva i teške metale, koji stvaraju selektivni pritisak potičući rasprostranjenost MDR bakterija i rezistentnih gena (Karkman i sur. 2018).

Uređaji za obradu otpadnih voda ne uklanjaju u potpunosti antibiotike, pa tako pročišćene otpadne vode dopijevaju u površinske i u podzemne prirodne vodotoke (Alexander i sur. 2020). Osobito zabrinjavajući problem je ukoliko otpadne vode sa životinjskih farmi dopiju na polja gdje se uzgajaju biljke za prehranu ljudi ili životinja. Takve biljke su rezervoari rezistentnih gena i rezistentnih bakterijskih izolata (Accinelli i sur. 2007). Stajsko gnojivo s farmi sadrži antibiotike, a poljoprivredne površine se tretiraju takvim gnojivom. Iz gnojiva biljke akumuliraju antibiotike te se nadalje nemetabolizirani antibiotici mogu prenositi kroz hranidbeni lanac (Gothwal i Shashidhar 2015).

U postrojenjima za obradu otpadnih voda nalazi se velika koncentracija bakterija koje su zbog konstantnog miješanja otpadne vode u stalnom kontaktu. Ako se u obzir uzme i visoka koncentracija hranjivih tvari uz prisustvo selektivnih tvari (metali, antibiotici), svi navedeni uvjeti olakšavaju i omogućavaju horizontalni prijenos rezistentnih gena. Temeljem niza analitičkih istraživanja, identificirana je učestala prisutnost ESBL-producirajućih *Enterobacteriaceae* u bolničkim, ali i u vanbolničkim

okruženjima. Prema tome, na osnovu brojnih provedenih studija jasno je da su otpadne vode rezervoari rezistentnih bakterijskih izolata i rezistentnih gena (Osińska i sur. 2020; Dincer i Yigittekin 2017).

Koncentracija antibiotika u postrojenjima otpadnih voda kreće se u rasponu od nekoliko ng/L pa do par  $\mu\text{g/L}$ . Navedene vrijednosti su sub-inhibitorne koncentracije tj. nisu dovoljne da bi inhibirale ili ubile bakterije, ali pak te doze omogućuju prednost u rastu određenim rezistentnim izolatima (Serwecińska 2020). Budući da su bakterijski organizmi izloženi sub-inhibitornim koncentracijama antibiotika to im omogućava razvoj rezistentnih mehanizama kojim se olako rasprostranjuju u okolišu. Tako npr. u Španjolskoj u bolničkim otpadnim vodama koncentracije antibiotika iznose 10 do 30 ng/L (Gómez i sur. 2006), u Vijetnamu više od 40  $\mu\text{g/L}$  (Thai i sur. 2018), u Singapuru 70  $\mu\text{g/L}$ , dok se u zagrebačkim komunalnim vodama koncentracija antibiotika kreće od 100 i 1000 ng/L. Velik problem je taj što još uvijek u zakonskoj regulativi ne postoje propisi za reguliranje ispuštanja antibiotika iz raznih izvora u okoliš (Senta i sur. 2013). Rezistentni mikroorganizmi mogu utjecati na mikrobiotu u ekosustavu što dovodi do poremećaja kruženja organske tvari u okolišu (Bbosa i sur. 2014).



**Slika 5.** Prikaz rasprostranjenosti rezistentnih bakterija i gena za rezistenciju iz različitih izvora u okoliš:

- (1) otpadne vode i bolnica;
- (2) gnojenje usjeva stajskim gnojem;
- (3) usjevi koji su gnojeni sa stajskim gnojivom i otpadnim vodama;
- (4) konzumacija usjeva;
- (5) konzumacija mesnih i mliječnih proizvoda;
- (6) konzumiranje vode koja je u kontaktu s otpadnim vodama;
- (7) prijenos putem insekata i divljači;
- (8) putovanja.

Preuzeto i prilagođeno iz Murugadas i Prasad (2019).

### **1.13 ULOGA DIJAGNOSTIKE U BORBI PROTIV AMR-a: FENTOTIPSKA I GENOTIPSKA DIJAGNOSTIKA**

Dijagnostika ima ključnu ulogu u racionalnoj upotrebi antibiotika. Većina laboratorija za fenotipsko prepoznavanje AMR-a koristi testove za određivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove, kao što je antibiogram. Antibiogram prati rast mikroorganizama izloženih antibioticima. Međutim, jedan od nedostataka antibiograma je potreba za prethodnim kultiviranjem bakterijskih kultura prije testiranja. Nakon toga, potrebno je dodatno vrijeme za kultivaciju bakterija kako bi se utvrdilo postojanje rezistencije na antibiotike. To može dovesti do kašnjenja u dobivanju rezultata, što može produžiti vrijeme potrebno za postavljanje kliničke dijagnoze i rezultirati upotrebom empirijske terapije. Dodatni problem antibiograma je upotreba antibiotika širokog spektra kako bi se obuhvatila mogućnost multiple rezistencije bakterija. Ovaj problem bi se mogao riješiti bržom dijagnostikom koja uključuje skraćen vremenski period do rezultata. Sadašnje metode za određivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove zahtijevaju duži vremenski period za analizu i stručnost osoblja, jer interpretacija rezultata zahtijeva specifično i ažurirano znanje (Bard i Lee 2018).

S druge strane genotipski testovi za određivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove obično uključuju upotrebu PCR metode koja pruža visoku osjetljivost i specifičnost i omogućuje identifikaciju gena rezistencije. Ipak, genotipsko testiranje ima nekoliko ograničenja: (1) zahtijeva stručno osoblje i specijaliziranu opremu; (2) PCR je usmjeren na genetske sekvence, što znači da ne može detektirati nove mehanizme rezistencije; (3) genetska rezistencija ne rezultira uvijek stvarnom, tj. fenotipskom rezistencijom. U tom kontekstu, ključna su testiranja koja pružaju liječnicima najveću vrijednost informacija. Zato se ulažu veći napor u razvoj novih fenotipskih testova za antimikrobnu rezistenciju. Prednost fenotipskog pristupa u odnosu na genotipsku analizu je u tome što nije potrebno ciljati prethodno poznatu karakteristiku, kao što je gen rezistencije. Umjesto toga, ovaj pristup se temelji na ponašanju bakterije u stvarnom okruženju (Bard i Lee 2018).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati profil antimikrobne rezistencije bakterijskih izolata iz porodice *Enterobacteriaceae* izdvojenih iz ljudskog urogenitalnog sustava, te utvrditi prevalenciju izolata *Enterobacteriaceae* koje produciraju ESBL enzime. Istraživanjem se nastojao pružiti uvid u rezistenciju na antibiotike kod bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* u Hrvatskoj, identificirati antibiotike na koje su najčešće rezistentne te kvantificirati učestalost ESBL producirajućih izolata unutar porodice *Enterobacteriaceae*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 VREMENSKI PERIOD ISTRAŽIVANJA

Istraživanje sam provela na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu u razdoblju od 1. rujna do 31. prosinca 2021. godine. Izolati porodice *Enterobacteriaceae*, koje sam koristila u eksperimentalnom segmentu diplomskog rada, potekli su iz ljudskog urogenitalnog sustava i bili su izolirani od strane djelatnika Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i ustupljeni mi za potrebe izrade diplomskog rada na Biološkom odsjeku. Izolati porodice *Enterobacteriaceae* su dostavljeni na Biološki odsjek na hranjivim podlogama unutar Petrijevih zdjelica i bili su čiste bakterijske kulture što je prikazano na Slici 6.



**Slika 6.** Čista bakterijska kultura izolata porodice *Enterobacteriaceae*. Na slici je izolat *Escherichia coli* na hranjivoj podlozi.

##### 3.1.1 Hranjive podloge, aparatura i pribor, kemikalije

Sva aparatura, pribor i kemikalije, kao i hranjive podloge koje sam koristila za provedbu eksperimentalnog dijela diplomskog rada navedeni su u tekstu niže.

##### Hranjive podloge:

- Muller-Hinton agar (MH)
- Čvrste biokemijske podloge (Kliglerov trostruki šećer, Simmonsov citratni agar, HIP (H = produkcija H<sub>2</sub>S, I= produkcija indola, P= pokretljivost))
- Tekuće biokemijske podloge (laktaza, lizin, ornitin, urea).

**Aparatura i pribor:**

- Inkubator
- Biozaštitni kabinet
- Dispensor za antibiotike
- Petrijeva ploča, metalna bakteriološka ušica, stalak za epruvete, epruvete, sterilni vateni štapić, kapaljka.

**Kemikalije:**

- 0,9% fiziološka otopina
- Boje za bojanje po Gramu
- Metilensko modriilo.

**3.2 BIOKEMIJSKI TESTOVI**

Ukoliko na osnovu morfološkog izgleda kolonija poraslih na hranjivom mediju nisam bila sigurna o kojoj vrsti *Enterobacteriaceae* je riječ, koristila sam hranjive podloge za određivanje biokemijskih osobina bakterija. Temelj biokemijskih podloga jest dokazivanje prisutnosti ili odsutnosti bakterijskih enzima tj. na temelju metaboličkih svojstva bakterije moguće je identificirati vrstu bakterije. Podloge sadržavaju hranjive tvari koje bakterijski enzimi mogu razgraditi te ukoliko bakterija razgrađuje hranjivu tvar podloga mijenja boju, a ukoliko ne razgrađuje podloga boje ostaje nepromijenjena. Promjena boje u biokemijskim podlogama posljedica je pH indikatora koji reagiraju s produktima bakterijskog metabolizma. pH indikator u biokemijskim podlogama mijenja boju ovisno o kiselosti (pH) okoline. Npr. ako bakterija fermentira šećer iz podloge kao krajnji produkt razgradnje šećera nastat će kiselina. Kiselina će sniziti pH podloge, a indikator će promijeniti boju. Ako bakterija ne fermentira šećer, pH se neće promijeniti i boja će ostati nepromijenjena. Sve biokemijske podloge koje sam koristila bile su proizvođača Liofilchem, Italija. Biokemijski niz uobičajeno čine: Kliglerov trostruki šećer, citirat, laktoza 10%, lizin i ornitin, urea, HIP (Slika 9). Podloge, u tekućem ili čvrstom stanju nalaze se u epruvetama. Bakterijske kolonije sam na biokemijske podloge nanosila tako što sam pikirala sterilnom bakteriološkom ušicom jednu koloniju s hranjive podloge na kojoj su izrasle, te u svaku čvrstu podlogu sam bakteriološkom ušicom nanijela tu bakterijsku koloniju (napravila ubod pomoću bakteriološke ušice). Za tekuće podloge sam uzela novu bakterijsku koloniju iste

morfologije i uronila bakteriološku ušicu u tekuću podlogu. Prije toga sam žarila bakteriološku ušicu na plinskom plameniku kako ne bi došlo do kontaminacije. Potom sam biokemijske podloge stavila u inkubator na 36 °C tijekom 18 do 24h, a sljedeći dan sam interpretirala rezultate (Slika 9). Na biokemijskim hranjivim podlogama, unatoč tome ako ne dođe do metaboliziranja hranjivih tvari iz podloge od strane bakterija tj. ako se boja podloge nije promijenila, moguć je porast biomase bakterija.

	KLIGLER gluk/lakt/H <sub>2</sub> S		CITRAT	LAKTOZA 10%	LIZIN	ORNITIN	UREA/F.A.	H <sub>2</sub> S	INDOL	POKRETLJIVOST
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	/	/	-	-	+	+
<i>Klebsiella spp.</i>	+	+	-	+	/	/	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	+	-	/	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	+	-	/	-	+	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	/	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Citrobacter koseri</i>	+	+	-	+	/	-	-	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	/	+	+	/	-	-	+	-	+
<i>Citrobacter amalonat</i>	+	/	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	/	-	-	+	+	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	/	-	-	+	+	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	-	+	+	/	+	+
<i>Providencia rettgeri</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Providencia stuartii</i>	+	+	-	-	-	/	+	-	+	+
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	-	-	+	+	/	-	-	+
<i>Salmonella spp.</i>	+	-	-	/	+	+	-	-	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	/

Slika 7. Interpretacija *Enterobacteriaceae* na osnovu biokemijskog niza.

### 3.2.1 Kliglerov trostruki šećer

Kliglerova podloga je crvena hranjiva podloga koja uključuje tri šećera: glukozu, laktozu i saharozu. Dodatno, u njoj se nalazi i željezo (II) sulfat, koji služi kao indikator za detekciju H<sub>2</sub>S-a, te fenol crveno kao pH indikator. Nakon perioda inkubacije, analizirala sam je li bakterija fermentirala šećer. Ako bakterija fermentira neki od šećera, kao produkt reakcije nastala je kiselina koja mijenja boju podloge zbog promjene pH vrijednosti. Početna pH vrijednost podloge iznosi 7.4, no fermentacijom šećera pH se smanjuje, tj. postaje kiseliji. To rezultira promjenom boje podloge iz neutralne crvene u kiselu žutu. Ako kosina podloge zadrži crvenu boju, a dubina postane žuta, to ukazuje na fermentaciju samo glukoze. Ako su i kosina i dubina žuti, to znači da je bakterija fermentirala i glukozu i laktozu. Ukoliko su bakterije tijekom metaboličke reakcije stvarale H<sub>2</sub>S, on je reagirao s ionima željeza iz podloge pri čemu se stvorio FeS koji se očituje kao pojava crnog taloga na dnu epruvete.

### 3.2.2 Simmonsov citratni agar

Simmonsov citratni agar je podloga zelene boje koja se sastoji od natrijeva citrata i bromtimol plavo kao indikatora pH. Pojedine bakterije mogu koristiti citrat kao jedini izvor ugljika. Ako bakterije koriste citrat iz podloge tada se boja podloge iz zelene (neutralni pH) mijenja u modro plavu (alkalna reakcija) jer razgradnjom citrata nastala je natrijeva lužina pri čemu je došlo do porasta pH podloge. Ukoliko bakterije ne koriste citrat podloga ostaje zelene boje.

### 3.2.3 Laktoza

Laktoza 10% je tekuća podloga sa slojem parafina, svijetlo ružičaste je boje. Osim laktoze, koja je izvor ugljikohidrata bakterijama, podloga sadrži i neutralni pH indikator (fenol crveno), te peptone koji su izvor aminokiselina i dušika. Ovim testom se dokazivala fermentacija laktoze. Ukoliko je reakcija pozitivna dolazi do promjene boje iz svjetlo ružičaste u boju ciklame. Do promjene boje dolazi jer se smanjuje pH podloge, odnosno postaje kiselij zbog nastanka kiseline prilikom fermentacije laktoze. Ako bakterija ne fermentira laktozu, ne dolazi do promjene boje podloge.

### 3.2.4 Lizin i ornitin

Lizin i ornitin su tekuće podloge koje imaju sloj parafina. Ovim testovima se identificiraju bakterije koje mogu razgraditi navedene aminokiseline. Sastav hranjive podloge lizina je glukoza, lizin, triptofan, bromkrezol ljubičasto kao pH indikator. Početni pH podloge je između 6.7-6.9. Ukoliko su bakterije mogle metabolizirati lizin, pri tom su mogle koristiti glukožu, čijom fermentacijom je nastala kiselina koja smanjuje pH i tada indikator mijenja boju iz ljubičaste u žutu. Kiselo okruženje je stimuliralo aktivnost enzima dekarboksilaze koja dekarboksilira lizin uklanjajući karboksilnu skupinu iz njega. Produkt dekarboksilacije lizina je kadaverin koji je alkalni spoj. Zbog prisustva kadaverina pH podloge raste i indikator ponovo postaje ljubičast (promjena podloge boje: ljubičasto → žuto → ljubičasto). Ukoliko bakterija nije metabolizirala lizin nije došlo do promjene boje podloge.

Ornitin se koristi za diferencijaciju mikroorganizama na temelju sposobnosti dekarboksilacije aminokiseline ornitina. Sastav hranjive podloge ornitina je glukoza, lizin, te kao pH indikator koristi se bromkrezol ljubičasto. Obično je početni pH oko 6.8. Bromkrezol ljubičasta mijenja boju ovisno o pH medija: kod kiselog pH (pH ispod 6.8) boja je žuta, dok je kod alkalnog pH (pH iznad 6.8) boja ljubičasta. Ako bakterija dekarboksilira ornitin, nastaju alkalne tvari što uzrokuje porast pH i promjenu boje indikatora u ljubičastu.



### 3.2.5 Urea

Urea je tekuća podloga bez parafina koja sadrži ureu kao izvor ugljika, fenilalanin te fenol crveno kao indikator pH vrijednosti. Ako je došlo do razgradnje uree djelovanjem enzima ureaze, kao produkt reakcije nastao je amonijak koji uzrokuje porast pH medija pri čemu indikator pH mijenja boju podloge iz narančaste u boju ciklame. Ako nije došlo do promjene boje podloge, bakterija ne proizvodi ureazu tj. ne može razgraditi ureu.

### 3.2.6 HIP

HIP je podloga kojom se dokazuje: H = produkcija H<sub>2</sub>S, I= produkcija indol, P= pokretljivost. Podloga se sastoji od glukoze kao izvora ugljikohidrata, triptofana, željezo (II) sulfata te bromkrezol ljubičasto kao pH indikatora. Početni pH medija je obično između 7.3-7.4. Ukoliko bakterije produciraju H<sub>2</sub>S u podlozi će biti vidljiv crni talog, zato što H<sub>2</sub>S reagira s ionima željeza pri čemu se stvara FeS. Ukoliko ne produciraju H<sub>2</sub>S neće doći do nastanka crnog taloga. Ako bakterije mogu razgraditi triptofan pomoću enzima nastat će indol koji se detektira dodavanjem Erlichovog ili Kovačevog reagensa što rezultira pojavom ružičasto obojenog prstena na vrhu hranjive podloge. Pozitivan test pokretljivosti pokazuje difuzno zamućenje cijele podloge, dok je kod negativnog testa zamućenje vidljivo samo uz liniju uboda koja je nastala prilikom uranjanja bakteriološke ušice u hranjivu podlogu.

## 3.3 TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA PORODICE *ENTEROBACTERIACAE* NA ANTIBIOTIKE

Ispitala sam osjetljivost dobivenih bakterijskih izolata porodice *Enterobacteriaceae* na antibiotike (Tablica 1) pomoću disk-difuzijske metode po Kirby-Bauer-u na Mueller-Hinton-ovom agaru (MH, Liofilchem, Italija). Disk-difuzijska metoda temelji se na difuziji antibiotika određene koncentracije koji su impregnirani na papirnatim diskovima. Antibiotik difundira kroz agar i stvara određeni gradijent koncentracije. Ako oko diska nastane područje gdje nije vidljiv porast bakterija, to se područje naziva zona inhibicije rasta bakterija i tada je riječ o osjetljivosti bakterije na taj antibiotik. MH podloga je standardna hranjiva podloga koja se koristi za ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike. Iz bakterijske kulture, s čvrste hranjive podloge na kojoj su porasle bakterijske kolonije pomoću bakteriološke ušice uzela sam 3-5 kolonija iste morfologije. Od njih sam načinila suspenziju u 5 mL 0,9% fiziološke otopine gustoće suspenzije 0,5 MacFarlanda (McF). Načinjenu suspenziju koristila sam za testiranje osjetljivosti izolata na antibiotike i u nju sam uronila sterilni vateni štapić. Pomoću vatenog štapića nanijela sam suspenziju u tri različita smjera po površini MH agara. Unutar 15 minuta, dispensorom ili pincetom na MH agar postavila sam

papirnatu dijagnostičke diskove natopljene antibioticima određene koncentracije. Vrlo je važno da su diskovi s antibioticima dovoljno udaljeni jedan od drugoga kao i od samog ruba ploče, jer je na takav način moguće pravilno izmjeriti promjer inhibicijske zone bez da je došlo do preklapanja zona s drugim antibioticima. Nasijanu MH podlogu s antibioticima stavila sam u inkubator s aerobnom atmosferom na temperaturu 37°C, tijekom 16-24h.

**Tablica 1.** Prikaz korištenih dijagnostičkih diskova natopljenih antibiotikom određene koncentracije za disk-difuzijsku metodu po Kirby-Baueru. Svi su antibiotici bili proizvođača Mast Diagnostica GmbH, Mas group, Njemačka.

Kratica	Antibiotik	Koncentracija
AUG	amoksicilin - klavulanska kiselina	20-10µg
CRO	Ceftriakson	30µg
CFX	Cefaleksin	30µg
CXM	Cefuroksim	30µg
AP	Ampicilin	10µg
CAZ	Ceftazidim	10µg
NI	Nitrofurantoin	100µg
FOX	Cefoksitin	30µg
GM	Gentamicin	10µg
CFM	Cefiksim	5µg
TS	trimetoprim - sulfametoksazol	1.25-23.75µg
NOR	Norfloksacin	10µg
FOT	Fosfomicin	200µg
AK	Amikacin	30µg
PTZ	piperacilin-tazobactam	30-6µg
CPM	Cefepim	30µg
IMI	Imipenem	10µg
CIP	Ciprofloksacin	5µg
ETP	Ertapenem	10µg
CZA14	ceftazidim – avibaktam	10-4µg
C/T	ceftolozan – tazobaktam	30-10µg
MEM	Meropenem	10µg

IMR	imipenem – relebaktam	10-25µg
FDC	Cefiderokol	30µg

### 3.3.1 Interpretacija antibiograma

Nakon inkubacije, sljedeći dan interpretirala sam antibiogram tj. inhibicijske zone mjerene u milimetrima pomoću ravnala. Rezultate sam očitala prema kriterijima EUCAST-a (2021. godina) prikazanim u Tablici 2. Prema smjernicama EUCAST-a dobiveni rezultat može biti definiran kao: osjetljiv (S, eng. susceptible), srednje osjetljiv (I, eng. intermediate) ili rezistentan (R, eng. resistant).

**Tablica 2.** EUCAST smjernice za interpretaciju osjetljivosti izolata porodice *Enterobacteriaceae* na diskove natopljene antibioticima točno određene koncentracije disk-difuzijskim testom po Kirby-Bauer metodi. Kategorija S je oznaka za izolat koji je osjetljiv na antibiotik, kategorija R je oznaka za izolat koji je rezistentan na antibiotik. Preuzeto s EUCAST (Clinical Breakpoint Tables v. 11.0, valid from 2021-01-01, [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)).

Antibiotik	Promjer zone (mm)	
	S ≥	R <
AUG	16	16
CRO	25	22
CFX	14	14
CXM	19	19
AP	14	14
CAZ	22	19
NI	11	11
FOX	19	19
GM	17	17
CFM	17	17
TS	14	11
NOR	22	22
FOT	24	24
AK	18	18
PTZ	20	20
CPM	27	24
IMI	22	19
CIP	25	22
ETP	25	25
CAZ14	13	13

C/T	22	22
MEM	22	16
IMR	22	22
FDC 30	22	22

### 3.3.2 Fenotipsko ispitivanje produkcije $\beta$ -laktamaza proširenog spektra

Detekciju ESBL-a sam radila uglavnom za izolate *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, ali ponekad su se pojavile iznimke i za druge izolate porodice *Enterobacteriaceae*. Za dokazivanje ESBL izolata koristila sam metodu dvostrukog disk-sinergijskog testa (eng. double disk synergy test; DDST). DDST metoda temelji se na sinergizmu između cefalosporina proširenoga spektra i nekog inhibitora  $\beta$ -laktamaza, najčešće je riječ o klavulanskoj kiselini. U svrhu dokazivanja ESBL enzima koristila sam cefalosporine III. generacije tj. ceftazidim 10 $\mu$ g (CAZ) i ceftriakson 30 $\mu$ g (CRO) te amoksicilin sa klavulanskom kiselinom 20-10 $\mu$ g (AUG). Provođenje testa za dokazivanje ESBL enzima odradila sam na jednak način kao što sam radila disk-difuzijsku metodu, samo je razlika u rasporedu antibiotika. Za dokazivanje ESBL enzima koristila sam preko-noćnu kulturu testiranoga izolata i pripremila sam bakterijski inokulum, kojeg sam pomoću sterilnog vatenog štapića nanijela u tri različita smjera na MH agar. Nakon toga sam na površinu MH agara pincetom nanijela diskove antibiotika sljedećim rasporedom CAZ-AUG-CRO. Vrlo je važno da AUG bude u sredini, a sa strane cefalosporini III. generacije. Razmak između diskova od centra do centra mjereći ravnalom trebao bi biti oko 2 cm, jer ako je izolat rezistentan tada je taj razmak smanjen na 1 cm. MH ploču s nanesenim diskovima antibiotika sam stavila u termostat na inkubiranje 18-24h pri temperaturi 37 °C u aerobnoj atmosferi. Nakon inkubacije interpretirala sam rezultate prema smjernicama EUCAST (2021. godina). U ovom sinergijskom testu mjerila sam utjecaj AUG na cefalosporine III. generacije. Produkcija ESBL enzima bila je potvrđena deformacijom inhibicijske zone rasta oko cefalosporina III. generacije u smjeru centralnoga diska AUG. Test je bio pozitivan ako se vidjelo proširenje zone inhibicije bakterijskog rasta ili deformacije zone oko bilo kojeg diska s cefalosporinima III. generacije u smjeru diska s AUG (Slika 9).



**Slika 8.** Prikaz produkcije ESBL enzima.

## 4. REZULTATI

Moj diplomski rad bio je usmjeren na vrste koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Tablica 3 pruža uvid u identificirane izolate porodice *Enterobacteriaceae* koji produciraju ESBL enzime, kao i onih koji ne produciraju ESBL enzime. Izdvojenih izolata porodice *Enterobacteriaceae* koji ne produciraju ESBL enzime bilo je 708, a izolata ESBL *Enterobacteriaceae* 77.

**Tablica 3.** Pregled izolata porodice *Enterobacteriaceae* koje produciraju ESBL enzime i onih koje ne produciraju ESBL enzime. U zagradi je dan broj izdvojenih izolata svake bakterijske vrste porodice *Enterobacteriaceae*.

<b>Izolati porodice <i>Enterobacteriaceae</i> (708) i ESBL izolati porodice <i>Enterobacteriaceae</i> (77)</b>
<i>Citrobacter freundii</i> (2)
<i>Citrobacter koseri</i> (37)
<i>Enterobacter agglomerans</i> (3)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex (7)
<i>Escherichia coli</i> (534)
<i>Klebsiella aerogenes</i> (11)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (8)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> complex (57)
<i>Klebsiella</i> sp. (3)
<i>Morganella morganii</i> (9)
<i>Proteus mirabilis</i> (33)
<i>Proteus vulgaris</i> (3)
<i>Serratia marcescens</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL (1)
<i>Escherichia coli</i> ESBL (41)
<i>Klebsiella aerogenes</i> ESBL (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL (13)
<i>Morganella morganii</i> ESBL(1)
<i>Proteus mirabilis</i> ESBL (3)
<i>Proteus vulgaris</i> ESBL(1)
<i>Serratia marcescens</i> ESBL(1)

Iz ljudskog urogenitalnog sustava izdvojeni su izolati *Enterobacteriaceae*, uključujući one koji produciraju ESBL enzime te one koji ih ne produciraju. U Tablici 4 je vidljiv prikaz izolata ESBL porodice *Enterobacteriaceae* izdvojenih iz ljudskog urogenitalnog sustava. Među izolatima koji produciraju ESBL dominirala je *Escherichia coli* (50), a poslije nje *Klebsiella pneumoniae* (16). *Escherichia coli* je najčešće bila porijeklom iz urina (41), a najrjeđe iz briseva uretre (1) i ejakulata (1). Pet izolata *Escherichia coli* ESBL porijeklom je iz briseva cerviksa i dva iz briseva rodnice. Od 16 izolata *Klebsiella pneumoniae* ESBL, najčešće

ih je porijeklom iz urina (13), a najrjeđe iz brisa rodnice (1), dok su dva izolata porijeklom iz briseva cerviksa. Sljedeći ESBL izolati su isključivo identificirani samo u urinima: *Klebsiella aerogenes* (4), *Proteus mirabilis* (3), te po jedan izolat *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*. Vidljivo je da je najčešće izdvojenih izolata bilo porijeklom iz urina (65), a najrjeđe iz briseva uretre (1) i ejakulata (1). Iz briseva cerviksa izolirano je sedam izolata, a iz briseva uretre tri. U brisevima glansa, vagine i vulve nisu identificirani ESBL izolati.

**Tablica 4.** Identificirani ESBL producirajući izolati porodice *Enterobacteriaceae* iz ljudskog urogenitalnog sustava.

ESBL izolati	Bris cerviksa	Bris glansa	Bris rodnice	Bris uretre	Bris vagine	Bris vulve	Ejakulat	Urin
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	5	0	2	1	0	0	1	41
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0	1	0	0	0	0	13
<i>Morganella morganii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1

U Tablici 5 su prikazani izolati porodice *Enterobacteriaceae* koji ne produciraju ESBL enzime. Izolati su izdvojeni iz ljudskog urogenitalnog sustava. Ukupno je izdvojeno 708 izolata. Od vrsta je dominirala *Escherichia coli* s 534 izolata, najčešće porijeklom iz urina (347), a najrjeđe iz brisa glansa (2). Najrjeđe izolirana vrsta je *Serratia marcescens*. Samo jedan izolat je identificiran u urinu. Sljedeća najčešće izolirana vrsta bila je *Klebsiella pneumoniae* complex (57). Na osnovu tabličnog prikaza, može se zaključiti da su najčešće identificirani izolati porijeklom iz briseva cerviksa (147), zatim briseva urina (107), a najrjeđe u

brisevima vulve (9) i glansa (9). U brisevima uretre uočeno je 33 izolata, a u brisevima rodnice 38, dok je 18 izolata identificirano iz ejakulata.

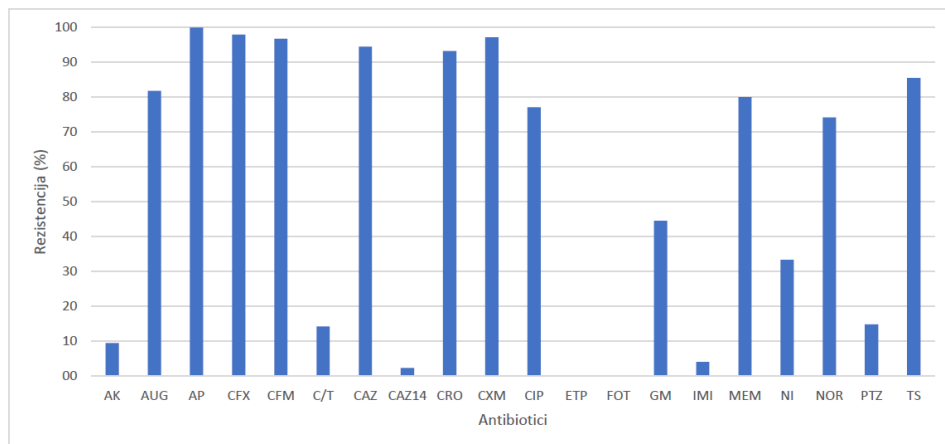
**Tablica 5.** Izolati porodice *Enterobacteriaceae* koji ne produciraju ESBL enzime izolirani iz ljudskog urogenitalnog sustava.

Izolati <i>Enterobacteriaceae</i>	Bris cerviksa	Bris glansa	Bris rodnice	Bris uretre	Bris vagine	Bris vulve	Ejakulat	Urin
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Citrobacter koseri</i>	4	3	2	5	0	0	3	20
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	0	0	2	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	1	0	0	0	0	4
<i>Escherichia coli</i>	125	2	29	18	0	4	9	347
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0	0	2	0	0	1	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	1	2	0	0	0	5
<i>Klebsiella pneumoniae complex</i>	11	0	3	2	0	0	1	40
<i>Klebsiella sp.</i>	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Morganella morganii</i>	0	0	1	1	0	0	0	7
<i>Proteus mirabilis</i>	3	1	3	1	0	0	5	20
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1



#### 4.1 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI IZOLATA *ENTEROBACTERIACAE*

Ispitivanje osjetljivosti izolata *Enterobacteriaceae* na antibiotike provedeno je disk-difuzijskom metodom i metodom dvostrukog-sinerijskog testa. Važno je istaknuti da neke vrste imaju prirodnu rezistenciju prema određenim antibioticima. Tako su *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* primarno rezistentni na ampicilin. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Morganella morganii* i *Serratia marcescens* su primarno rezistentni na amoksicilin s klavulanskom kiselinom. Primarna rezistencija izolata na antibiotike pomaže pri identifikaciji vrste bakterijskog izolata. Analizom antibiograma utvrđena je rezistencija izolata *Enterobacteriaceae* na antibiotike (Slika 9). Ampicilin (AP), kao predstavnik  $\beta$ -laktamskih antibiotika, pokazuje 100% rezistenciju na ispitivane izolate. Od 74 ispitivana izolata niti i jedan izolat nije pokazao osjetljivost na AP. Ova apsolutna rezistencija čini ga najizraženijim u kategoriji  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Piperacilin u kombinaciji s tazobaktamom (PTZ) pokazao je dobru osjetljivost na izolate *Enterobacteriaceae*. U odnosu na druge testirane antibiotike ima znatno povoljniju stopu rezistencije od svega 14.8% (11). To sugerira njegov potencijal kao preferirani izbor protiv određenih ESBL izolata. Gledajući usporedbe rezistencije kod cefalosporina, stopa rezistencije cefaleksina (CFX) je 98% (50). Nadalje od cefalosporina visoke stope rezistencije su zabilježene i kod: cefiksima (CFM) s 96.8%, cefuroksima (CXM) sa stopom rezistencije od 97.2% (71), ceftazidima (CAZ) s 94.5% (70), ceftriaksona (CRO) s 93.2% (69). Od fluorokinolona, ciprofloksacin (CIP) s rezistencijom od 77.1% (54) tek malo nadmašuje norfloksacin (NOR) s 74.2% (46). Kod aminoglikozidi stope rezistencije su sljedeće: gentamicin (GM) 44.5% (33), a amikacin (AK) s nižom stopom rezistencije od 9.46% (7). Među karbapenemima, meropenem (MEM) privlači pažnju s visokom stopom rezistencije od 80% (20). Od svih šest testiranih izolata na ertapenem (ETP), ni jedan izolat nije pokazao rezistenciju na njega. Kod imipenema (IMI) rezistencije je iznosila 4%. Od 74 testirana izolata na IMI, samo tri izolata su bila rezistentna na njega. Na nitrofurantoin (NI) su testirana 57 izolata, od toga njih je 33.3% (19) bilo rezistentno na NI. Sulfonamidni antibiotik koji kombinira trimetoprim s sulfametoksazolom (TS) ima stopu rezistencije od 85.5% (63). Fosfomicin (FOT) nije bio rezistentan na ispitivane izolate, dok kombinirani antibiotici, poput ceftazidim-avibaktama (CAZ14) i ceftolozan-tazobaktama (C/T), pokazuju umjerene stope rezistencije. CAZ14 od 2.3% (2), a C/T 14.2% (9).



**Slika 9.** Postotak rezistencije izolata *Enterobacteriaceae* na antimikrobne lijekove. Antibiotici: amikacin (AK), amoksicilin+ klavulanska kiselina (AUG), ampicilin (AP), cefaleksin (CFX), cefiksim (CFM), ceftolozan + tazobaktam (C/T), ceftazidim (CAZ), ceftazidim-avibaktam (CAZ14), ceftriakson (CRO), cefuroksim (CXM), ciprofloksacin (CIP), ertapenem (ETP), fosfomicin (FOT), gentamicin (GM), imipenem (IMI), meropenem (MER), nitrofurantoin (NI), norfloksacin (NOR), piperacin + tazobaktam (PTZ), trimetoprim + sulfametoksazol (TS).

## 5. RASPRAVA

Nesumnjivo se nalazimo u eri kada AMR postaje sve izraženija i predstavlja ozbiljan znanstveni i klinički izazov. Pored sve češće rezistencije bakterija na antibiotike, rezistencija virusa, gljivica i parazita na trenutno korištene antimikrobne lijekove također je česta. *Enterobacteriaceae* su među najučestalijim uzročnicima IMS-a, kako u bolničkom tako i vanbolničkom okruženju. U bolničkom okruženju njihova stopa rezistencije je puno češća i često je to riječ o MDR izolatima (Tambić Andrašević i sur. 2018). Rezistencija MDR izolata na antibiotike postala je izrazito važno javnozdravstveno pitanje koje izaziva sve veću zabrinutost u zdravstvenom sustavu i organizacijama koje se bave praćenjem rezistencije. Uvođenjem antibiotika u medicinsku praksu, čovječanstvo je postiglo značajnu prednost u borbi protiv infekcija, ali ta prednost postupno slabi. Danas su bakterije te koje imaju prednost jer se brzo umnažaju, mijenjaju, lako prenose gene horizontalnim transferom, razvile su brojne mehanizme rezistencije (Kalenić i sur. 2013). Iako su stručnjaci od početka ere antibiotika bili svjesni potencijalnog razvoja rezistencije, na što je upozorio već i sam Fleming (Högberg i sur. 2010), unatoč tome nastojali su vjerovati da će izum novih antibiotika riješiti problem. Kako bi se istaknula težina situacije glede AMR i usporedila s tradicionalnim svjetskim pandemijama, epidemija rezistencije Gram negativnih bakterija nazvana je "Crvena kuga" (Almirante i sur. 2013).

Izolati koji produciraju ESBL enzime prvi put su identificirani u Njemačkoj tijekom 1980-ih. Danas je poznato da su globalno rašireni i predstavljaju izazov u liječenju bolničke i vanbolničke populacije. ESBL enzimi su identificirani među vrstama Gram negativnih bakterija, ali ipak najveća prevalencija ESBL enzima primijećena je unutar porodice *Enterobacteriaceae* (Gniadkowski 2001). U ovom istraživanju korišteno je sveukupno 785 izolata porodice *Enterobacteriaceae* porijeklom iz ljudskog urogenitalnog sustava. Od toga je 77 izolata koji produciraju ESBL enzime, a 708 izolata su vrste koje ne produciraju ESBL enzime. Među izolatima porodice *Enterobacteriaceae* koji produciraju ESBL enzime, najčešće izolirana vrsta u ovom istraživanju bila je *Escherichia coli* ESBL. Od ukupno izoliranih 77 izolata, 50 izolata je pripadalo *Escherichia coli* ESBL i najčešće je bila porijeklom iz urina (41), a najrjeđe iz briseva uretre (1) i ejakulata (1). Također, *Escherichia coli* je bila dominantna vrsta i među izolatima koji ne produciraju ESBL enzime. Od ukupno izdvojenih 708 izolata, 534 izolata su pripadala *Escherichia coli* od čega je njih 347 najčešće porijeklom iz urina, a najrjeđe iz brisa glansa (2). U provedenoj studiji Marijan i suradnici (2007), na području Zagreba i Zagrebačke županije, također su utvrdili prevalenciju *Escherichia coli* u odnosu na druge bakterije porodice *Enterobacteriaceae*. Razlog tomu jest što je *Escherichia coli* jedan od najčešćih uzročnika IMS-a bez obzira na dob i spol pacijenata (Ronald 2002). Drugi najčešći izdvojeni izolat kod ESBL producirajućih i

neproducirajućih *Enterobacteriaceae* bila je *Klebsiella pneumoniae*. Od 16 izolata *Klebsiella pneumoniae* ESBL, najčešće je bila izdvojena iz urina (13), a najrjeđe iz brisa rodnice (1). Od 57 izdvojenih ESBL neproducirajućih izolata *Klebsiella pneumoniae*, najčešće je bila porijeklom iz urina (40), a najrjeđe iz briseva vulve (1). Najrjeđe izolirani izolati ESBL *Enterobacteriaceae* su: *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*. Bio je izdvojen po jedan izolat iz urina. Kod *Enterobacteriaceae* koje ne produciraju ESBL enzime najrjeđe izdvojeni izolat bila je *Serratia marcescens* (1) i to iz urina. ESBL izolati nisu bili identificirani u brisevima glansa, vagine i vulve. U studiji Khawcharoenporn i suradnika (2013) također je kao najčešći izolirani uropatogen iz urina bila *Escherichia coli* (72%), te kao drugi najčešći izolirani uropatogen *Klebsiella* spp. (15%). *Serratia* spp. je bila izolirana samo kod onih pacijenata koji su imali IMS rezistentne na više antibiotika. Studija koju je proveo Ibrahimagić 2014. godine na području Zeničko-dobojskog kantona pružila je uvid u učestalost rezistencije ESBL producirajućih izolata. Učestalost bakterija koje produciraju ESBL enzime varira od područja do područja. Prema Ibrahimagićevom istraživanju, prevalencija ESBL producirajućih izolata iznosila je 10% kod bolničke populacije, a 6.4% kod vanbolničke populacije. U ovom istraživanju postotak ESBL producirajućih *Enterobacteriaceae* bio je 10%. Kada se napravi usporedba s drugim zemljama, moglo bi se reći da je to prilično nizak postotak produkcije ESBL enzima. Npr. postotak ESBL producirajućih izolata u Portugalu je 34%, Italiji 37%, SAD-u 44%, zemljama Latinske Amerike 30-60% i Turskoj 58%. Dok su u Švedskoj (3%), Japanu (4%) i Singapuru (8%) zabilježeni manji postotci ESBL producirajućih izolata (French i sur. 1996). Prema podacima koje navodi Andrašević i suradnici, u Hrvatskoj je 2008. godine postotak izolata *Escherichia coli* koji produciraju ESBL enzime bio 3%, dok je za *Klebsiella pneumoniae* postotak iznosio 29% (Andrašević i sur. 2009). U ovom istraživanju, pak su ESBL izolati *Escherichia coli* (41) bili češće izolirani nego li izolati *Klebsiella pneumoniae* (16).

AMR je glavna briga u suvremenom zdravstvu, a važnost praćenja i razumijevanja ovog fenomena je od presudne važnosti za učinkovito kliničko upravljanje. Analiza ovog provedenog istraživanja pružila je uvid rezistencije ESBL izolata *Enterobacteriaceae*. Ispitana je osjetljivost izolata *Enterobacteriaceae* na sljedeće grupe antibiotika:  $\beta$ -laktame, karbapeneme, fluorokinolone, aminoglikozide, nitrofurane.

$\beta$ -laktamski antibiotici su temeljna klasa antibiotika korištena u borbi protiv bakterijskih infekcija. Najčešća su skupina korištenih antibiotika zbog niske toksičnosti, visoke efikasnosti u liječenju infekcija i širokog spektra djelovanja (Tambić Andrašević i sur. 2012). Ovim istraživanjem pružen je uvid u to da su svi testirani izolati porodice *Enterobacteriaceae* bili rezistentni na ampicilin (100%). Od svih korištenih  $\beta$ -laktama u ovom istraživanju, ampicilin je pokazao najviši postotak rezistencije na ESBL izolate

*Enterobacteriaceae*. Samo osam godina nakon što se ampicilin krenuo klinički primjenjivati, 1965. godine, opisana je prva  $\beta$ -laktamaza koja ga je mogla efikasno hidrolizirati. Riječ je bila o TEM 1  $\beta$ -laktamazi (Pfeifer i sur. 2010). Rezultati tog istraživanja su potkrijepljeni i u istraživanju kojeg je proveo Ibrahimagić na području Bosne i Hercegovine. Kod bolničke populacije, u njegovom istraživanju, zabilježen je vrlo visok postotak rezistencije izolata ESBL na ampicilin (98%), dok je kod vanbolničke populacije rezistencija na ampicilin bila 95% (Ibrahimagić 2014). I u istraživanju iz 2019. godine (Tomić Paradžik 2019) koje je provedeno u Hrvatskoj zabilježena je 100% rezistencija izolata *Escherichia coli* na ampicilin i kod bolničke i vanbolničke populacije. Odbor za praćenje rezistencije i potrošnju antibiotika u Hrvatskoj, naglašava kako je postotak rezistencije *Escherichia coli* na ampicilin u konstantom porastu. *Escherichia coli* iskazuje značajnu rezistenciju prema ampicilinu. U 2021. godini u Hrvatskoj rezistencija *Escherichia coli* prema ampicilinu iznosila je 48% (Tambić Andrašević i sur. 2021), dok je godinu ranije (2020) bila i veća (51%). Kod izolata *Proteus mirabilis* koji je pretežno uzročnik vanbolničkih infekcija, 2021. godine zabilježen je visok postotak rezistencije na ampicilin (46%) (Tambić Andrašević i sur. 2021). *Klebsiella pneumoniae* je prirodno rezistentna na ampicilin/amoksisilin te se za ovu vrstu ne provodi testiranje na ampicilin. Rodovi *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. i *Serratia* spp. imaju inducibilne cefalosporinaze, zbog čega su rezistentne na ampicilin. *Klebsiella pneumoniae* je čest uzročnik bolničkih infekcija i kontinuirano pokazuje porast rezistencije na druge  $\beta$ -laktame, vjerojatno zbog dugog izlaganja antibiotskoj terapiji pacijenata u bolnicama (Tambić Andrašević i sur. 2018).

Na osnovu dobivenih rezultata ovog istraživanja, rezistencija izolata *Enterobacteriaceae* prema cefalosporinima ukazuje na potrebu preispitivanja njihove upotrebe, osobito uzimajući u obzir visoke postotke rezistencije izolata *Enterobacteriaceae* na cefuroksim (97.2%) i cefaleksin (98%). Najviši postotak rezistencije dokazan je kod cefaleksina. Nadalje, od cefalosporina visoki postotci rezistencije zabilježeni su i kod: cefiksima (96.8%), ceftazidima (94.5%) i ceftriaksona (93.2%). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem su u skladu s rezultatima koje su dobili Tambić Andrašević u svom istraživanju, analizirajući postotak rezistencije cefalosporina na izolate *Enterobacteriaceae* u Republici Hrvatskoj. Posebna zabrinutost je glede rezistencije *Escherichia coli* na cefuroksim (Tambić Andrašević i sur. 2018). Ono što ističe Odbor za praćenje rezistencije i potrošnju antibiotika u Hrvatskoj (Tambić Andrašević i sur. 2021) je primjena cefuroksima (oralnog ili parenteralnog). U obzir treba uzeti nove smjernice EUCASTA koje su na snazi od 2020. Za oralni cefuroksim postoje kategorije osjetljivosti "S" i "R" i on se preporučuje primarno za liječenje nekompliciranih uroinfekcija, dok parenteralni cefuroksim se može koristiti za liječenje sistemskih infekcija, ali pri višim dozama i za njega postoje kategorije "I" i "R". Rezistencija na oralni cefuroksim u

Hrvatskoj, prema rezultatima koje ima Odbor, slična je onoj iz prethodne godine tj. 10% u 2021. naspram 11% u 2020., dok je za parenteralni cefuroksim stopa rezistencije nepromijenjena (10%).

Novi kombinirani pripravci cefalosporina s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza, kao što su ceftazidim + avibaktam i ceftalozan + tazobaktam pokazali su se vrlo učinkovitim protiv ESBL izolata. U Hrvatskoj 2021. godine rezistencija *Escherichia coli* prema ovim antibioticima iznosi manje od 1% te je čak i manja u odnosu na piperacilin + tazobaktam prema kojem je rezistentno 4% izolata (Tambić Andrašević i sur. 2021). U mom istraživanju piperacilin u kombinaciji s tazobaktamom očituje znatno povoljan postotak rezistencije od svega 14.8%, a dok kombinirani antibiotici, poput ceftazidim + avibaktama i ceftolozan + tazobaktama, pokazuju umjerene stope rezistencije od 2.9% i 14.2%. Kada je riječ o rezistenciji *Klebsiella pneumoniae* na cefalosporine u 2021. godini U Hrvatskoj i dalje je u izrazito visokom postotku rezistentna na navedene antibiotike, ali važno je istaknuti da kombinirani antibiotik ceftazidim + avibaktam prema njoj pokazuje dobru osjetljivost (Tambić Andrašević i sur. 2021).

Cefalosporini III. generacije, poput ceftazidima, tradicionalno su se smatrali važnim oruđem protiv ESBL producirajućih organizama, no danas se smatra da njihova učinkovitost može biti narušena. U početku većina *Enterobacteriaceae* bila je osjetljiva na njih, ali ubrzo se pojavila rezistencija, posebice kod onih *Enterobacteriaceae* koje prirodno proizvode niske količine kromosomske *AmpC*  $\beta$ -laktamaze (Andrašević i sur. 2009). Vremenom se sve češće uviđa rezistencija na cefalosporine III. generacije zbog  $\beta$ -laktamaza s proširenim spektrom djelovanja. Izolati s produkcijom ESBL često su rezistentni na više lijekova i predstavljaju značajan problem u tretmanu bolničkih infekcija, osobito kod pacijenata u kritičnom stanju (Tambić Andrašević i sur. 2012).

Što se tiče rezistencije izolata *Enterobacteriaceae* na fluorokinolone u mom istraživanju zabilježen je visok postotak njihove rezistencije, ali pak taj postotak je manji u odnosu rezistencije  $\beta$ -laktama. Među fluorokinolonima, ciprofloksacin ima postotak rezistencije 77,1%. Neznatno manji postotak rezistencije ima norfloksacin 74,1%. Dobiveni rezultati rezistencije fluorokinolona u ovom istraživanju su u skladu i sa drugim studijama. Tako u studiji iz 2018. godine u Hrvatskoj je zabilježen visok postotak rezistencije na ciprofloksacin, posebice kod *Escherichia coli* (20%) (Tambić Andrašević i sur. 2018). Iz podataka 2021. od strane Odbora koji se bavi praćenjem rezistencija u Republici Hrvatskoj, za *Escherichia coli* rezistencija na ciprofloksacin je neznčajno promijenjena npr. 2017. godine bila je 20%, ali od tada stagnira i ne razlikuje se bitno od prošlogodišnjih stopa (npr. 14% u 2012. i 2013. g., 17% u 2014. g., 18% u 2015. g., 19% u 2016. g., 20% u 2017. g. i 2018. g., 19% u 2019. g., 18% u 2020. g., 19% u 2021. g.) (Tambić Andrašević i sur. 2021).

Međutim prema istim tim podacima, za *Klebsiella pneumoniae* je pak zabilježena više stopa rezistencije na ciprofloksacin i 2021. godine bila je 41%.

Rezultati analize rezistencije izolata *Enterobacteriaceae* na aminoglikozide u mom istraživanju pružaju zanimljivu dinamiku njihove rezistencije. Gentamicin ima značajno viši postotak rezistencije (44%) na izolate *Enterobacteriaceae* u usporedbi s amikacinom (9.5%). Time se može zaključiti da je amikacin bolji izbor terapije za liječenje IMS-a. Rezultati mog istraživanja glede rezistencije aminoglikozida na izolate *Enterobacteriaceae* su u skladu i sa drugim istraživačkim radovima. U studiji iz 2018. godine koju je proveo Jelić na području Republike Hrvatske evidentirana je rezistencija na aminoglikozide. Prema njegovim rezultatima 68.4% izolata bilo je rezistentno na gentamicin i 10.8% na amikacin (Jelić 2018). Prema podacima Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021. godini zabilježena je rezistencija *Escherichia coli* na gentamicin (9%), a amikacin (1%). Izolati *Klebsiella pneumoniae* su imali slične postotke rezistencije na aminoglikozide, gentamicin (11%), a na amikacin (2%). Dok je *Proteus mirabilis* imao više postotke rezistencije na aminoglikozide u odnosu na *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Na gentamicin 19% na amikacin 9% (Tambić Andrašević i sur. 2020). Rezistencija aminoglikozida na izolate *Enterobacteriaceae* je bila poprilično visoka i u studiji koji je proveo Ibrahimagić (Ibrahimagić 2014). Prema njegovoj studiji rezistencija na aminoglikozide kod bolničke i vanbolničke populacije iznosila je 60-90% što je puno više u usporedbi sa Europom (25%) (Winokur i sur. 2001).

Testirani izolati porodice *Enterobacteriaceae*, u mom istraživanju, pokazali su dobru osjetljivost na nitrofurantoin. Od testiranih 57 izolata, njih 19 je pokazalo rezistenciju na nitrofurantoin. Moji rezultati su u skladu i s drugim studijama. U studiji Tambić Andrašević (2018. godine), nisu uočene značajne stope rezistencije na nitrofurantoin, te se on smatra dobrim izborom za liječenje IMS-a (Tambić Andrašević i sur. 2018). Dobra osjetljivost nitrofurantoina na izolate *Enterobacteriaceae* vidljiva je i od strane Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj. Tako prema podacima iz 2021. kod *Escherichia coli* je zabilježen postotak rezistencije 3% na nitrofurantoin. Da je dobar izbor terapije pokazuje i činjenica da se u posljednjih 5 godina potrošnja nitrofurantoina značajno povećala, što pak s druge strane dovodi do bojaznosti zbog stvaranja rezistencije na njega (Tambić Andrašević i sur. 2021).

Analizom ovog istraživanja pružen je uvid u rezistenciju na karbapenemske antibiotike kod ESBL izolata porodice *Enterobacteriaceae*. Glede karbapenemske rezistencije u ovom istraživanju dobiveni su rezultati koji se djelomično podudaraju s rezultatima drugih studija. Od svih šest testiranih izolata na ertapenem niti i jedan izolat nije pokazao rezistenciju na ertapenem. S druge strane veliku pažnju privlači meropenem s visokom rezistencijom od 80%. Kod imipenema rezistencije je bila 4% tj. od 74 testirana

izolata na imipenem, samo tri izolata su bila rezistentna na njega. Uspoređujući rezultate sa studijom koju je proveo Jelić u periodu od 2012.-2013. godine na području Hrvatske gotovo svi analizirani izolati pokazali su smanjenu osjetljivost prema ertapenemu, dok je manji broj izolata imao smanjenu osjetljivost na imipenem i meropenem. Među izolatima porodice *Enterobacteriaceae* prema njegovoj studiji ističe se *Klebsiella pneumoniae* koja je pokazala visok postotak rezistencije na karbapeneme 60.4% (Jelić 2018). Također u studiji Tambić-Andrašević zabilježena je rezistencija na ertapenem u izolata *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* (Tambić Andrašević i sur. 2018). Povećana rezistencija *Enterobacteriaceae* na ertapenem rezultat je biološke predispozicije za lako razvijanje rezistencije, jer je za nju dovoljna kombinacija produkcije enzima ESBL i smanjenje propusnosti kroz promjene u porinskim kanalima (Paterson 2005). U mom provedenom istraživanju imipenem je antibiotik koji je pokazao dobru osjetljivost na ESBL izolate (4%) u odnosu na druge karbapeneme što je i u skladu s rezultatima drugih autora koji navode da je imipenem jedan od boljih izbora za liječenje infekcija uzrokovanih ESBL izolatima (Lee i sur. 2010; Rodríguez-Bano i sur. 2004). Do intenzivne primjene karbapenema dolazi zbog sve češćeg porasta infekcija uzrokovanih izolatima s produkcijom ESBL. Mehanizmi rezistencije na karbapeneme uključuju ili produkciju enzima karbapenemaza ili smanjenje propusnosti bakterijske stjenke (Jelić 2018). Pojava karbapenemaza kod *Enterobacteriaceae* poznata je od sredine 1980-ih kada su karbapenemi prvi put uvedeni u terapiju (Tambić Andrašević i sur. 2012). Međutim rezistencija na karbapeneme još uvijek nije visoka i zabrinjavajuća, ali širenje bakterijskih izolata koji proizvode karbapenemaze, posebice izolata *Klebsiella pneumoniae*, postaje ozbiljna briga. Trenutačno se *Enterobacteriaceae* koje su rezistentne na karbapeneme najčešće pojavljuju kao uzročnici infekcija u bolničkom okruženju (Tambić Andrašević i sur. 2018).

Rezultati istraživanja provedeni u okviru ovog diplomskog rada pružili su prije svega uvid koje su sve vrste porodice *Enterobacteriaceae* izolirane iz ljudskog urogenitalnog sustava. Najčešće izolirane su bile *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* porijeklom iz urina. Ovaj rad također pruža uvid i u rezistenciju izolata *Enterobacteriaceae*. Postotak rezistencije izolata na antibiotike, osobito na  $\beta$ -laktamske antibiotike iz godine i godinu biva sve češći i viši, što potvrđuju rezultati ovog istraživanja, kao i drugih studija. Najviši postotak rezistencije pokazao je ampicilin. No, obećavajuće je što je imipenem pokazao jako dobru osjetljivost na izolate *Enterobacteriaceae*. ESBL enzimi su oni koji najčešće doprinose razvoju rezistencije. Smješteni su na opsežnim plazmidima koji također sadrže gene odgovorne za rezistenciju prema fluorokinolonima, aminoglikozidima i trimetoprim-sulfametoksazolu. U ovom trenutku, karbapenemi se smatraju prvim izborom terapije ozbiljnih infekcija izazvanih izolatima koji produciraju ESBL enzime (Paterson 2006). Posebna zabrinutost se javlja zbog sve češće rezistencije izolata MDR koji bivaju sve više



i više zastupljeni. Rezistencija na antibiotike predstavlja ozbiljan problem javnom zdravstvu pa shodno tome, treba ju ozbiljno shvaćati. Jako je važno pratiti, ali i primjenjivati smjernice koje donese SZO i EUCAST glede rezistencija na antibiotike.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata ovog diplomskog rada moguće je izvesti nekoliko zaključaka:

- Prevalencija izolata koji produciraju ESBL bila je relativno niska (10%).
- Rezistencija *Enterobacteriaceae* na  $\beta$ -laktamske antibiotike bila je visoka, posebno na ampicilin (100%). Također cefalosporini III. generacije pokazali su visok postotak rezistencije, posebice cefuroksim (97%) i cefaleksin (98%). Nadalje, visoki postotci rezistencije uočeni su i za cefiksime (97%), ceftazidim (95%) te ceftriakson (93%).
- Karbapenemi, posebno ertapenem, bili su djelotvorni protiv ESBL producirajućih izolata. Niti jedan izolat nije pokazao rezistenciju na ertapenem. Rezistencija na imipenem iznosila je 4%.
- Izolati porodice *Enterobacteriaceae* bili su umjereno rezistentni na kombinirane antibiotike poput ceftazidim + avibaktam (3%) i ceftolozan + tazobaktam (14%). Piperacilin u kombinaciji s tazobaktamom je imao postotka rezistencije svega 15%.
- Rezistencija izolata *Enterobacteriaceae* na fluorokinolone i aminoglikozide u ovom istraživanju ukazala je na potencijalni problem u budućem liječenju infekcija uzrokovanih ovim bakterijama. Kod aminoglikozida uočena je visoka rezistencija izolata *Enterobacteriaceae* na gentamicin (44%), dok je postotak rezistencije za amikacin bio 10%. Shodno tome može se zaključiti da je amikacin bolji izbor terapije za liječenje. Među fluorokinolonima, ciprofloksacin imao je postotak rezistencije 77%. Neznatno manji postotak rezistencije imao je norfloksacin 74%.

## 7. LITERATURA

1. Accinelli, C., Koskinen, W. C., Becker, J. M., Sadowsky, M. J. (2007): Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (7), 2677-2682.
2. Alexander, J., Hembach, N., Schwartz, T. (2020): Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports*. 10 (1), 8952.
3. Almira, B., Garnacho-Montero, J., Pachón, J., Pascual, Á., Rodríguez-Baño, J (2013): Scientific evidence and research in antimicrobial stewardship. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31, 56-61.
4. Alnajjar, S., Gupta, R. S. (2017): Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection, Genetics and Evolution*. 54, 108-127.
5. Aminov, R. I. (2010): A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. 1, 134.
6. Andrašević, S., Tambić Andrašević, A. (2006): Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus*. 15 (2\_UG infekcije), 245-250.
7. Andrašević, S., Vranić-Ladavac, M., Tambić-Andrašević, A. (2009): Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik*. 29 (4), 171-176.
8. Apisarnthanarak, A., Kiratisin, P., Mundy, L. M. (2008): 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. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 29 (11), 1026-1034.
9. Bard, J. D., Lee, F. (2018): Why can't we just use PCR? The role of genotypic versus phenotypic testing for antimicrobial resistance testing. *Clinical Microbiology Newsletter*. 40 (11), 87-95.
10. Baylay, A. J., Blair, J. M., Webber, M. A., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. V. (2015): Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 13 (1), 42-51.
11. Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., Ntale, M. (2014): Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*. 6, 410-425.
12. Bedenić, B. (2009): Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović-Kamberović, S. (ur.) *Medicinska mikrobiologija*. Zenica, Štamparija Fojnica d.o.o., str. 221-251.

13. Bedenić, B. (2004):  $\beta$ -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji. Liječnički Vjesnik. 126, 314-24.
14. Bedenić, B., Sardelić, S., Ladavac, M. (2015): Multirezistentne bakterije. Acta medica Croatica, 69 (3), 211-215.
15. Bedenić, B., Sardelić, S., Vranić-Ladavac, M., Barišić, N., Ladavac, R. (2014): Karbapenemaze Gram-negativnih bakterija. Liječnički vjesnik. 136 (3-4), 94-103.
16. Bonnet, R. (2004): Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48 (1), 1-14.
17. Bradford, P. A. (2001): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews. 14 (4), 933-951.
18. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner T.A. (2013): Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition. McGraw Hill Medical. 7 (3), 273-275
19. Bubonja-Šonje, M. Abram, M. (2014): Globalno širenje bakterija koje proizvode karbapenemaze. Medicina Fluminensis. 50 (2), 128-149.
20. Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010): Stanica: molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb.
21. Datta, N., Kontomichalou, P. (1965): Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 208, 239-241.
22. Davies, J. (2006): Where have all the antibiotics gone?. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. 17 (5), 287-290.
23. Dincer, S., Yigittekin, E. S. (2017): Spreading of antibiotic resistance with wastewater. Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery. 73, 74-97
24. Etebu, E., Ariekpar, I. (2016): Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research. 4 (2016), 90-101.
25. Farmer, J. J., Farmer, M. K., Holmes, B. (2010): The *Enterobacteriaceae*: general characteristics. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 2, 1317-1359.
26. Fouz, N., Pangesti, K. N., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., Abd El Ghany, M. (2020): The contribution of wastewater to the transmission of antimicrobial resistance in the environment: implications of mass gathering settings. Tropical Medicine and Infectious Disease. 5 (1), 33.

27. French, G. L., Shannon, K. P., Simmons, N. (1996): Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (2), 358-363.
28. Frieri, M., Kumar, K., Boutin, A. (2017): Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. 10 (4), 369-378.
29. Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D. G. (2014): Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 8 (02), 129-136.
30. Gould, K. (2016): Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71 (3), 572-575.
31. Gothwal, R., Shashidhar, T. (2015): Antibiotic Pollution in the environment: a review. *Clean–Soil, Air, Water*. 43 (4), 479-489.
32. Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D. (2006): Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*. 1114 (2), 224-233.
33. Gniadkowski, M. (2001): Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clinical Microbiology and Infection*. 7 (11), 597-608.
34. Gužvinec, M., Butić, I., Jelić, M., Bukovski, S., Lucić, S., Tambić Andrašević, A. (2012): Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. *Infektološki glasnik*. 32 (2), 71-80.
35. Högberg, L. D., Heddini, A., Cars, O. (2010): The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends in pharmacological sciences*. 31 (11), 509-515.
36. Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. (2019): Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*. 51, 72-80.
37. Ibrahimagić, A. (2014): Epidemija infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama koje produciraju  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra, plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze i karbapenemaze u bolničkih i vanbolničkih pacijenata. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.
38. Jacoby, G. A., Munoz-Price, L. S. (2005): The new  $\beta$ -lactamases. *New England Journal of Medicine*. 352 (4), 380-391.
39. Jelić, M. (2018): Mehanizmi rezistencije na antibiotike u enterobakterija otpornih na karbapeneme. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

40. Kalenić, S., Abram, M., Batinić, D., Beader, N., Bedenić, B., Bošnjak, Z. i sur. (2013): Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb.
41. Kalenić, S. (2000): The resistance of Bacteria to Antibiotics. *Medicus*. 9 (2), 149-153.
42. Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017): Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*. 33 (3), 300-305.
43. Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., Virta, M. P. (2018): Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in Microbiology*. 26 (3), 220-228.
44. Keyes, K., Lee, M. D., Maurer, J. J. (2008): Antibiotics: mode of action, mechanisms of resistance, and transfer. *Microbial Food Safety in Animal Agriculture*. 25 (42), 49-55.
45. Khawcharoenporn, T., Vasoo, S., Singh, K. (2013): Urinary tract infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: prevalence and risk factors in a Chicago Emergency Department. *Emergency Medicine International* 2013. 2013, 258517.
46. Kirmusaoğlu, S., Gareayaghi, N., Kocazeybek, B. S. (2019): Introductory chapter: the action mechanisms of antibiotics and antibiotic resistance. In *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen.
47. Kosalec, I. i sur. (2021): Antimikrobna rezistencija-izazovi i rješenja. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu.
48. Lee, D. S., Lee, C. B., Lee, S. J. (2010): Prevalence and risk factors for extended spectrum beta-lactamase-producing uropathogens in patients with urinary tract infection. *Korean Journal of Urology*. 51 (7), 492-497.
49. Livermore, D. M. (1995): Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 8 (4). 557-584.
50. Lobanovska, M., Pilla, G. (2017): Focus: drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 90 (1), 135-145.
51. Matthew, M. (1979): Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 5 (4), 349-358.
52. Munita, J. M., Arias, C. A. (2016): Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 4 (2), 481-511.
53. Murugadas, V., Prasad, M. M. (2019): Antimicrobial Resistance and fishery waste management: Risks and safety concerns. *ICAR-Central Institute of Fisheries Technology*. 5, 277-288.

54. Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Konopka, I. (2020): Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 381, 121221.
55. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo, R. A. (2011): Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55 (11), 4943-4960.
56. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 (4), 657-686.
57. Paterson, D. L. (2006): Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*. 34 (5), 20-28.
58. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., International Klebsiella Study Group. (2003): Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47 (11), 3554-3560.
59. Payerl-Pal, M. (2009): Potrošnja antibiotika u hrvatskim bolnicama. *Infektološki glasnik*. 29 (4), 157-164.
60. Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W. (2010): Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300 (6), 371-379.
61. Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., Poirel, L. (2005): Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56 (1), 52-59.
62. Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., Dedysh, S. (2015). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). W. B. Whitman (Ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
63. Reygaert, W. C. (2018): An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 4 (3), 482.
64. Rodríguez-Bano, J., Navarro, M. D., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M. A., Perea, E. J., Pascual, A. (2004): Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (3), 1089-1094.
65. Rubtsova, M. Y., Ulyashova, M. M., Bachmann, T. T., Schmid, R. D., Egorov, A. M. (2010): Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry*. 75, 1628-1649.

66. Sabtu, N., Enoch, D. A., Brown, N. M. (2015): Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *British Medical Bulletin*. 116 (1), 105-113.
67. Samaha-Kfoury, J. N., Araj, G. F. (2003): Recent developments in  $\beta$  lactamases and extended spectrum  $\beta$  lactamases. *Bmj*. 327 (7425), 1209-1213.
68. Senta, I., Terzic, S., Ahel, M. (2013): Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Research*. 47 (2), 705-714.
69. Serwecińska, L. (2020): Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*. 12 (12), 3313.
70. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010): The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2 (5), a000414.
71. Šalković-Petrišić, M., Bradamante, V. (2010): Beta-laktamski antibiotici (i): Penicilini. Medicinar, e-nastavni članak. Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
72. Takada, Y., Itoh, H., Paudel, A., Panthee, S., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Inoue, M. (2020): Discovery of gramicidin A analogues with altered activities by multidimensional screening of a one-bead-one-compound library. *Nature Communications*. 11 (1), 4935.
73. Tambić Andrašević, A. (2007): Otpornost bakterija na antibiotike - vodeći problem medicine u 21. stoljeću. *Medicina*. 43 (2007), 7-14.
74. Tambić Andrašević, A., Jelić, M., Gužvinec, M., Butić, I. i Bukovski, S. (2012): Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj - uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini. *Infektološki glasnik*. 32 (2), 45-52.
75. Tambić Andrašević, A., Lucić, S. i Tambić, T. (2018): Antibiotic resistance in Croatia. *Medicina Fluminensis*. 54 (3), 312-321.
76. Tambić Andrašević, A., Žmak, Lj., Obrovac, M., Payerl Pal, M. i sur. (2020): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2020. g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb.
77. Tambić Andrašević, A., Žmak, Lj., Obrovac, M., Payerl Pal, M. i sur. (2021): Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2021. g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb.
78. Thai, P. K., Binh, V. N., Nhung, P. H., Nhan, -P. T., Hieu, N. Q., Dang, N. T., Anh, N. T. K. (2018): Occurrence of antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria in effluents of pharmaceutical manufacturers and other sources around Hanoi, Vietnam. *Science of the Total Environment*. 645, 393-400.



79. Thomson, K. S. (2001): Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerging Infectious Diseases*. 7 (2), 333-336.
80. Tot, T., Kibel, S., Sardelić, S., Nemer, K., Benčić, A., Vraneš, J., Bedenić, B. (2021): Polyclonal spread of colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* in Croatian hospitals and outpatient setting. *Germs*. 11 (2), 163-178.
81. Valent, P., Groner, B., Schumacher, U., Superti-Furga, G., Busslinger, M., Kralovics, R., Sörgel, F. (2016): Paul Ehrlich (1854-1915) and his contributions to the foundation and birth of translational medicine. *Journal of Innate Immunity*. 8 (2), 111-120.
82. Walsh, C. (2003): Antibiotics: actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology (ASM)*. 13 (11), 3059-3060.
83. Winokur, P. L., Canton, R., Casellas, J. M., Legakis, N. (2001): Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clinical Infectious Diseases*. 32 (2), 94-103.
84. Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L. H. (2012): History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*. 25 (2), 67-77.
85. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., Hossain, N. (2017): A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*. 9(6).

Internetski izvori

86. EUCAST. (2021). Clinical Breakpoint Tables v. 11.0, valid from 2021-01-01. [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (pristupljeno 9.9.2023).

## 8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Matea Jurišić i rođena sam 28.5.1993. godine u Zenici. Nakon završetka Opće gimnazije u Katoličkom školskom centru u Žepču školovanje nastavljam na preddiplomskom studiju Biologija-Kemija u Mostaru na Fakultetu prirodoslovno-matematički odgojnih znanosti. Godine 2017. svoje školovanje nastavljam na prijediplomskom studiju Biologija u Zagrebu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu na Biološkom odsjeku. Nakon završetka prijediplomskog studija na Biološkom odsjeku upisujem 2020. godine diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija. Tijekom studiranja aktivno sam sudjelovala u Danima i noćima biologije kao i Festivalu Women in science i Simpoziju bioloških usmjerenja. Pohađala sam tečaj za osposobljavanje rada sa laboratorijskim životinjama, pohađala laboratorijske prakse, volontirala na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo te obavljala raznorazne studentske poslove.