

# Djelotvornost eravaciklina na enterobakterije otporne na karbapenem u uvjetima in vitro

---

Jurić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:809954>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivana Jurić

**Djelotvornost eravaciklina na enterobakterije otporne na  
karbapeneme u uvjetima *in vitro***

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Mareković i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

*Iskreno se zahvaljujem mentorici rada prof. dr. sc. Ivani Mareković na ukazanom povjerenje i pruženoj prilici da budem dio njezinog tima. Također hvala na velikoj podršci koju mi je pružila tijekom izrade ovog rada te na strpljenju, izdvojenom vremenu i profesionalnim savjetima pomoću kojih sam stekla nova znanja i vještine.*

*Hvala suvoditeljici rada izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće koja mi je uvijek bila spremna pomoći i odgovoriti na moja pitanja te se također zahvaljujem na svim savjetima, strpljenju i razumijevanju.*

*Hvala tehničarki Jani Škarecki na korisnim savjetima za samostalan rad u laboratoriju te na strpljenju i pomoći prilikom dobivanja potrebnih rezultata.*

*Od srca se zahvaljujem svim svojim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene i koji su mi pružali neprestanu potporu. Najviše hvala mojoj obitelji i Dinu koji su neskromno bili sve vrijeme uz mene te prolazili sa mnom lijepe i one manje lijepe trenutke u životu.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Djelotvornost eravaciklina na enterobakterije otporne na karbapeneme  
u uvjetima *in vitro*

Ivana Jurić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Enterobakterije otporne na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*, CRE) su razvile sposobnost stvaranja beta-laktamaza KPC, VIM, NDM i OXA-48 zbog sve veće uporabe karbapenema u kliničkoj praksi te predstavljaju veliku opasnost za ljudsko zdravlje. CRE su, osim na karbapeneme, otporne i na većinu ostalih antibiotika te stoga otežavaju liječenje hospitaliziranih bolesnika. Nastoje se razviti novi antimikrobni lijekovi poput eravaciklina koji je odobren za liječenje teških intraabdominalnih infekcija kod odraslih osoba. Cilj ovog istraživanja je bio odrediti osjetljivosti 80 sojeva CRE, izoliranih iz kliničkih uzoraka bolesnika, na eravaciklin te njegovu djelotvornosti *in vitro* na CRE s obzirom na tip karbapenemaze koju stvaraju. Metodama disk difuzije i E-testa potvrđeno je da je 67,5 % sojeva osjetljivo na eravaciklin gdje je *Klebsiella oxytoca* pokazala najveću otpornost od 60 %. S obzirom na vrstu karbapenemaze, sojevi koji produciraju OXA-48 pokazali su najveću osjetljivost na eravaciklin s ukupno 71,4 % osjetljivih sojeva. Po osjetljivosti slijede VIM sa 65,4 % te NDM s ukupno 61,1 % osjetljivih sojeva. Rezultati istraživanja pokazali su djelotvornost eravaciklina u uvjetima *in vitro* na CRE, ali se uspješna terapija eravaciklinom za infekcije uzrokovanih s CRE treba temeljiti na ispitivanju osjetljivosti fenotipskim metodama, molekularnim određivanjem vrste karbapenemaze, težini infekcije i osobitostima svakog pacijenta.

(46 stranica, 12 slika, 6 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: eravaciklin, enterobakterije otporne na karbapenem (CRE), beta-laktamaze, karbapenemaze, infekcije

Voditeljica: Prof. dr. sc. Ivana Mareković  
Suvoditeljica: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće  
Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće  
Prof. dr. sc. Jasna Hrenović  
Prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Rad prihvaćen: 28. studenog 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

*In vitro* efficacy of eravacycline on carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

Ivana Jurić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) have developed a mechanism for the production of KPC, VIM, NDM, and OXA-48 beta-lactamases due to the increasing use of carbapenem in clinical practice and pose a major risk to human health. CREs, in addition to carbapenem, are resistant to most other antibiotics and therefore make it difficult to treat hospitalized patients. New therapies have been sought to be approved, like eravacycline for the treatment of severe intra-abdominal infections in adults. This study aimed to determine the susceptibilities of 80 strains of CRE, isolated from clinical patient specimens, to eravacycline and its *in vitro* efficacy to CRE concerning the type of carbapenemase they produce. Disc diffusion and E-test methods confirmed that 67,5 % of CRE were sensitive to eravacycline where *K. oxytoca* showed the highest resistance of 60 %. Regarding the type of carbapenemase, the OXA-48 strains showed the highest susceptibility to eravacycline with a total of 71,4 % of susceptible strains, followed by VIM with 65,4 % and NDM with a total of 61,1 % of the susceptible strains. Test results have shown *in vitro* efficacy of eravacycline on CRE, but successful therapy with eravacycline for CRE infections should be based on susceptibility testing with phenotypic methods, molecular determination of the type of carbapenemase, severity of the infection, and the characteristics of each patient.

(46 pages, 12 figures, 6 tables, 37 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: eravacycline, carbapenem-resistant enterobacteria (CRE), beta-lactamases, carbapenemases, infections

Supervisor: Dr. Ivana Mareković

Cosupervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Dr. sc. Jasna Hrenović, Prof.

Dr. sc. Mirta Tkalec, Prof.

Thesis accepted: November 28, 2019.

**Korištene kratice na engleskom:**

**CFU:** jedinice koje formiraju koloniju

**cIAI:** komplicirana intraabdominalna infekcija

**CPE:** enterobakterije koje proizvode karbapenemaze

**CRE:** enterobakterije otporne na karbapenem

**cUTI:** komplicirana infekcija mokraćnog sustava

**EARS-Net:** Europske mreže za nadzor otpornosti antimikrobnih lijekova

**ECDC:** Europski centar za prevenciju bolesti i kontrolu

**ESBL:** beta-laktamaze proširenog spektra

**FDA:** Američka administracija za hranu i lijekove

**iv.:** intravenska

**KPC:** karbapenemaza *Klebsiella pneumoniae*

**MBL:** metalo-beta-laktamaze

**MU:** mjerna jedinica

**NDM:** New Delhi metalo-beta-laktamaza

**OXA-48:** oksicilinaza 48

**PCR:** polymerase chain reaction

**TDM:** praćenje terapijskih lijekova

**WHO:** Svjetska zdravstvena organizacija

**VIM:** Veronska integrin-kodirana metalo-beta-laktamaza

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. ENTEROBAKTERIJE OTPORNE NA KARBAPENEME .....	1
1.2. INFEKCIJE UZROKOVANE ENTEROBAKTERIJAMA OTPORNIMA NA KARBAPENEME .....	5
1.3. EPIDEMIOLOGIJA U EUROPI I HRVATSKOJ .....	9
1.3.1. RASPROSTRANJENOST ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME U EUROPI .....	9
1.3.2. POTENCIJAL ZA NASTANAK EPIDEMIJE U ZDRAVSTVU I ZAJEDNICI ..	12
1.3.3. MEĐUNARODNI ASPEKTI ZA EUROPSKE ZEMLJE I ZEMLJE TREĆEGA SVIJETA.....	13
1.4. MOGUĆNOSTI LIJEČENJA INFEKCIJA UZROKOVANIH ENTEROBAKTERIJAMA OTPORNIMA NA KARBAPENEME .....	14
1.4.1. STARE I NOVE MOGUĆNOSTI LIJEČENJA .....	14
1.4.2. POVIJEST TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA.....	18
1.4.3. ERAVACIKLIN .....	19
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	21
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI .....	22
3.2. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE POMOĆU METODE PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE .....	24
3.3. ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI METODOM DISK DIFUZIJE I E-TESTA .....	26
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	27
<b>4. REZULTATI</b> .....	28
4.1. IDENTIFIKACIJA SOJEVA MASENOM SPEKTROMETRIJOM .....	28
4.2. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE UZ POMOĆ METODE PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE .....	28
4.3. ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI METODOM DISK DIFUZIJOM I E-TESTOM .....	30
<b>5. RASPRAVA</b> .....	37
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	41
<b>7. LITERATURA</b> .....	42
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	46



# 1. UVOD

## 1.1. ENTEROBAKTERIJE OTPORNE NA KARBAPENEME

Povećana prevalencija bakterijske rezistencije na antibiotike je ozbiljan problem na globalnoj razini budući da infekcije uzrokovane ovim bakterijama dovode do sve većeg morbiditeta i mortaliteta (Sheu i sur. 2019). Stvaranje otpornosti na antibiotike je prirodni fenomen koji nastaje zbog prilagođavanja bakterija uvjetima okoliša. Uzrok rezistencije jesu mutacije u genomu i/ili izmjena genetičkog materijala među bakterijama koja je uvelike olakšana zbog određenih genskih informacija koje se uglavnom nalaze na pokretnim genetičkim elementima (Tambić Andrašević i sur. 2018). Ako dođe do promjene jednog para baza DNA tada je riječ o točkastim mutacijama, dok umetanjem ili gubitkom transpozona, insercijskih sljedova (integrona) i primanjem strane DNA procesom konjugacije, transformacije, transdukcije ili transpozicije dolazi do nastanka većih promjena u bakterijskom genomu koje se dalje šire horizontalnim ili vertikalnim prijenosom gena (Martinez i Baquero 2000). Uzrok razvoja rezistencije na antimikrobne lijekove svakako je njihova neracionalna uporaba, no loše organizirana prevencija i kontrola infekcija dovodi do lakšeg širenja novonastalih mutanti, što se najviše očituje u bolničkoj sredini (Tambić Andrašević i sur. 2018).

Mnoge prethodne studije su bile usredotočene na sprječavanje širenja multirezistentnih bakterija, a ponajviše na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Trenutno najveću prijetnju predstavljaju multirezistentne gram-negativne bakterije, osobito one koje su razvile otpornost na karbapeneme. Uz karbapenem-rezistentni *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, enterobakterije otporne na karbapeneme (eng. *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*, CRE) su na vrhu popisa Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organisation*, WHO) prioriternih patogena otpornih na antimikrobne lijekove te se može reći da trenutno predstavljaju najveću prijetnju zdravlju ljudi.

Enterobakterije obuhvaćaju porodicu gram-negativnih, nesporogenih štapića u kojoj se u 7 rodova nalaze uzročnici infekcija u ljudi. Primarne patogene čine enterobakterije iz roda *Salmonella* i *Shigella* te pojedine vrste iz roda *Escherichia* i *Klebsiella*. Oportunistički patogeni su *Cronobacter*, *Enterobacter* i *Citrobacter*, te je većina ovih bakterija dio normalne crijevnice čovjeka (tablica 1) (Nordmann i sur. 2011, Kalenić i sur. 2019). Enterobakterije

koje se ispituju u ovom istraživanju su *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* i *Citrobacter freundii* kao pet najznačajnijih i najčešćih kliničkih izolata otpornih na karbapeneme.

**Tablica 1.** Podjela enterobakterija s obzirom na patogenost za ljude. Preuzeto i prilagođeno prema radu Kalenić i sur. (2019).

Porodica	Patogenost	Rod	Vrsta
<i>Enterobacteriaceae</i>	Primarni patogeni	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> (određeni patotipovi)
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. granulomatisa</i>
		<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>
		<i>Shigella</i>	<i>S. sonnei</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. boydii</i> <i>S. dysenteriae</i>
	Oportunistički patogeni	<i>Cronobacter</i>	<i>C. sakazakii</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i>
		<i>Citrobacter</i>	<i>C. koseri</i>

Enterobakterije su jedna od najpromjenjivijih bakterijskih porodica. Zbog povećane prevalencije infekcija uzrokovanih enterobakterijama s proširenim spektrom beta-laktamaza (eng. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBLs), u svrhu liječenja su se počeli u velikoj mjeri koristiti karbapenemi. U ESBL beta-laktamaze je prvobitno svrstana SHV-2 beta-laktamaza, a nakon toga i čitav niz drugih enzima (TEM-1, TEM-2 i SHV-1) koji su uz pomoć pokretnih genetičkih elemenata razvili rezistenciju na cefalosporine širokog spektra djelovanja te su tako dobili naziv beta-laktamaze proširenog spektra (Matthew 1979). Zbog sve veće uporabe karbapenema u svrhu liječenja infekcija uzrokovanih ESBL sojevima došlo je do pojave enterobakterija koje proizvode posebnu vrstu beta-laktamaza - karbapenemaze (Sheu i sur. 2019).

Karbapenemi su beta-laktamski antimikrobni lijekovi koji inhibiraju transpeptidaze PBP 1 i PBP 2 te sprječavaju sintezu peptidoglikana stanične stijenke što dovodi do elongacije i lize bakterijskih stanica. Njihova djelotvornost se temelji na dobrom prodiranju kroz vanjsku

membranu gram-negativnih bakterija, visokom afinitetu za proteine koji vežu penicilin (eng. *Penicillin-Binding Proteins*, PBP) i stabilnosti pri djelovanju beta-laktamaza (Nordmann i Poirel 2002, Sheu i sur. 2019). Karbapenemi su antimikrobni lijekovi širokog spektra djelovanja protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. U beta-laktame, osim karbapenema, spadaju penicilini, cefalosporini i monobaktami koji dijele istu kemijsku građu, odnosno beta-laktamski prsten (Samaha-Kfoury i Araj 2003). Otpornost CRE na karbapeneme se temelji na dva mehanizma: proizvodnji karbapenemaza koje hidroliziraju jezgru karbapenema ili kombinaciji strukturnih mutacija koje dovode do proizvodnje drugih beta-laktamaza, kao što su AmpC cefalosporinaza i ESBL (Sheu i sur. 2019).

Beta-laktamaze gram-negativnih bakterija smještene su u periplazmatskom prostoru kako bi mogle djelovati na antibiotike prije no što dođu do ciljnog mjesta. Stupanj rezistencije bakterija ovisi o količini beta-laktamaza koje stvaraju, afinitetu beta-laktamaza za ciljani supstrat, brzini hidrolitičke reakcije, te propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija s naglaskom na broj i veličinu bakterijskih porina. Beta-laktamaze su hidrolitički enzimi koji razgrađuju amidnu vezu beta-laktamskog prstena karbapenema, penicilina, cefalosporina i monobaktama, a produkti takve enzim-supstrat reakcije su derivati bez antibakterijske djelotvornosti (Livermore 1995). S obzirom na mehanizam djelovanja postoje beta-laktamaze koje u svom aktivnom mjestu imaju aminokiselinu serin (serinske proteaze) i one čije aktivno mjesto sadrži cink (metalo-beta-laktamaze) (Jacoby i Munoz-Price 2005). Većina beta-laktamaza su serinske proteaze koje djeluju tako da se hidroksilna skupina aktivnog mjesta serina veže za beta-laktamski prsten antimikrobnog lijeka stvarajući kovalentni kiseli ester, a produkt ove hidrolitičke reakcije je aktivan enzim i inaktivan antibiotik. Ostatak beta-laktamaza djeluje na beta-laktamski prsten preko iona cinka koji je vezan za histidinski i/ili cisteinski ostatak. Zbog ovakvog načina djelovanja, koji je posredovan cinkom, nazivaju se metalo-beta-laktamaze (Livermore 1995). Molekularna klasifikacija prema Ambleru, na osnovu slijeda nukleotida i pripadnih aminokiselina, svrstava ove enzime u četiri klase A, B, C i D, s tim da su klase A, B i D drugačijeg evolucijskog podrijetla. U klasu A spadaju penicilinaze i većina ESBL beta-laktamaza, u skupinu B se primarno svrstavaju cefalosporinaze i metalo-beta-laktamaze, klasu C čine cefalosporinaze opisane prvi put 1981. godine, a skupinu D čine uglavnom enzimi koji hidroliziraju oksacilin - oksacilinaze (Ambler i sur. 1991, Jaurin i Grundstrom 1981, Bush i sur. 1995). Uz već spomenute ESBL beta-laktamaze i karbapenemaze, najznačajnije beta-laktamaze su AmpC koje uglavnom spadaju u C klasu. Javljaju se u svih enterobakterija osim

salmonele, a mogu se eksprimirati kao i sve ostale beta-laktamaze, konstitutivno ili inducibilno s kromosoma ili plazmida (Livermore 1995).

Karbapenemaze su heterogena skupina enzima koji spadaju u molekularnu klasu beta-laktamaza A, B i D (Nordmann i Poirel 2002). Karbapenemaze klase A i klase D su serin-beta-laktamaze, a karbapenemaze klase B su metalo-beta-laktamaze (Cui i sur. 2019). Geni koji kodiraju za karbapenemaze se najčešće nalaze na pokretnim genetičkim elementima (integronima, transpozonima i plazmidima), stoga je širenje takvih gena ubrzano, složeno i nepredvidivo (Nordmann i Poirel 2002). Karbapenemaze iz klase A mogu biti kodirane kromosomski poput NMC-A, SME-1, SME-2, SME-3 i IMI-1 ili plazmidno kao KPC-1 ili GES-2 (Bedenić i sur. 2012). Metalo-beta-laktamaze iz klase B spadaju u više porodica, a najznačajnije su IMP, VIM, GIM i SPM. Geni koji kodiraju ove enzime se nalaze na integronima, a insercijom u plazmide ili transpozone omogućava se prijenos među bakterijama (Kenneth i Thomson 2010). NDM je novija porodica metalo-beta-laktamaza, a enterobakterije koje ih stvaraju predstavljaju veliki terapijski problem jer plazmidi koji nose *bla<sub>NDM</sub>* gen mogu imati jako veliki broj determinanti rezistencije na antibiotike. Takvi geni se potom konjugacijom prenose na ostale sojeve bakterija što rezultira multirezistentnim fenotipom (Delpahande i sur. 2006). Primjer karbapenemaze iz klase D je intrizična OXA-51, a u stečene oksacilinaze spadaju OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58 i OXA-143 (Woodford i sur. 2006). Najučestalija karbapenemaza u enterobakterija iz klase A je *K. pneumoniae* karbapenemaza (eng. *K. pneumoniae Carbapenemase*, KPC), iz klase B New Delhi metalo-beta-laktamaza (NDM), Veronska integrin-kodirana metalo-beta-laktamaza (VIM) i imipenemaza (IMP), te oksacilinaza (OXA) iz klase D kao što je OXA-48 karbapenemaza. Klasifikacija i karakteristike najučestalijih karbapenemaza u CRE prikazane su u tablici 2. Ove karbapenemaze pokazuju varijabilnu rezistenciju na karbapeneme prilikom hidrolitičke aktivnosti karbapenema (što je hidrolitička aktivnost veća to su bakterije rezistentnije). Nedavno su nove kombinacije s inhibitorima beta-laktamaza stvorile nove terapijske mogućnosti za infekcije uzrokovane s CRE. Međutim, takvi novi inhibitori beta-laktamaza ne djeluju protiv svih karbapenemaza. Avibaktam inhibira KPC iz klase A i OXA-48 iz klase D, dok vaborbaktam i relebaktam inhibiraju samo KPC iz klase A (tablica 2) (Sheu i sur. 2019).

**Tablica 2.** | Klasifikacija i karakteristike glavnih karbapenemaza u enterobakterija. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sheu i sur. (2019).

Karbapenemaze	KPC	MBL (NDM, VIM, IMP)	OXA-48
Molekularni razred Ambler	A	B	D
Supstrati hidrolize	Svi beta-laktami	Svi beta-laktami osim aztreonama	Penicilini i karbapenemi
Inhibirani klasičnim inhibitorima beta-laktamaza	Minimalno	Ne	Ne
Inhibirani avibaktamom	Da	Ne	Da
Inhibirani vaborbaktamom	Da	Ne	Ne
Inhibirani relebaktamom	Da	Ne	Ne
Zajedničke vrste	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ,	NDM: <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> ; VIM:	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>K. pneumoniae</i> ; IMP: <i>K. pneumoniae</i>	

KPC, eng. *K. pneumoniae carbapenemase*; MBL, eng. *metallo-lactamase*; NDM, eng. *New Delhi metallo-lactamase*; VIM, eng. *Verona integrin-encoded metallo-lactamase*; IMP, eng. *imipenemase*; OXA, eng. *oxacillinase*.

## 1.2. INFEKCIJE UZROKOVANE ENTEROBAKTERIJAMA OTPORNIMA NA KARBAPENEME

Enterobakterije mogu uzrokovati teške infekcije kao što su infekcije krvi, izvanbolničke pneumonije, bolničke pneumonije, uključujući one povezane sa strojnom ventilacijom, komplicirane infekcije mokraćnog sustava i komplicirane intraabdominalne infekcije. Zbog toga rezistencija ovih bakterija na karbapeneme ima veliko kliničko značenje i socioekonomski utjecaj (Sheu i sur. 2019).

Prvi korak kod infekcija krvi je adhezija CRE na stanice sluznice putem specifičnih receptora, potom slijedi njihovo umnažanje na sluznici tj. kolonizacija, a nakon toga enterobakterije prolaze između stanica sluznice, npr. putem ždrijela i crijeva, u limfne čvorove te dalje u krvotok (Kuzman i Schönwald 2000). Osim toga, prodiranje infektivnih

patogena u krvotok se može desiti i putem invazivnih pomagala poput igala katetera. Infekcije krvi uključuju i infektivni endokarditis koji čini otprilike 3–8 % slučajeva infekcija krvi, infekcije krvi povezane s centralnim venskim kateterom, primarne bakteremije kojima je izvor nepoznat te sekundarne bakteremije nastale od žarišnih infekcija, uključujući apscese, osteomijelitis, infekcije mokraćnog sustava ili upalu pluća. Unatoč dostupnosti antimikrobnih lijekova širokog spektra i značajnom napretku zdravstvene skrbi, infekcije krvi su jedan od glavnih uzroka obolijevanja i smrtnosti. Gram-negativne bakterije uzrokuju 25-50 % svih infekcija krvi gdje ključnu ulogu igraju multirezistentne enterobakterije. Ovakve infekcije su usko povezane s već spomenutim intravenskim kateterima, infekcijama mokraćnog sustava, intraabdominalnim infekcijama i upalom pluća povezanom sa strojnom ventilacijom. Gram-negativne bakterije, uključujući CRE, često uzrokuju ili pospješuju nastanak sepse ili septičkog šoka (Franco-Paredes 2016). Sepsa nastaje kao posljedica upalne reakcije potaknute infekcijom. Rizična skupina za razvoj sepse su imunokompromitirani bolesnici, bolesnici nakon kirurških zahvata, prisutnost predisponirajućih čimbenika poput dijabetesa, ciroze ili malignih bolesti, te invazivnih pomagala kao što su endotrahealni tubusi te vaskularni i urinarni kateteri (Van Amersfoort i sur. 2003).

Pneumonija je akutna bolest donjeg dišnog sustava popraćena novonastalim radiološki verficiranim infiltratom za koji nema alternativnog obrazloženja. Izvanbolnička pneumonija stečena je izvan bolnice ili ustanove za starije i nemoćne. Za razliku od izvanbolničke, bolnička pneumonija se razvija 48 sati od prijema u bolnicu. Najčešće CRE povezane s ovom bolešću su klebsijele koje invadiraju u donji dišni sustav. Klinički simptomi su kašalj, promuklost, tjelesna temperatura iznad 38 °C te pleuritična bol. Izvanbolnička pneumonija se liječi uglavnom empirijski primjenjenom antimikrobnom terapijom, a budući da je najčešće uzrokovana pneumokokom, cijepljenje protiv ovog uzročnika je indicirano kod bolesnika starijih od 65 godina, onih s kroničnom bolešću ili imunokompetentnih bolesnika (Patterson i Loebinger 2012).

Bolnička pneumonija podrazumijeva postoperativnu upalu pluća, ali ne uključuje bolesnike s upalom pluća povezanom sa strojnom ventilacijom. Najčešći patogeni koji uzrokuju bolničku pneumoniju su gram-negativne bakterije i *S. aureus*. Simptomi uključuju slabost, vrućicu, kašalj, promuklost i bolove u prsima. Dijagnoza se, kao i za izvanbolničku pneumoniju, temelji na kliničkoj prezentaciji i rendgenskim snimkama prsnog koša, a etiološki se može dokazati hemokulturom i mikrobiološkom pretragom uzoraka iz donjih dišnih putova. Liječi se antimikrobnim lijekovima, a cjelokupna prognoza je loša, dijelom i

zbog komorbiditeta tj. popratnih bolesti. Također je važno naglasiti da se uzročnici razlikuju od onih koji uzrokuju izvanbolničku pneumoniju, što može zahtijevati početnu empirijsku terapiju antimikrobnim lijekovima širokog spektra djelovanja (Kalil i sur. 2016).

Bolnička pneumonija povezana sa strojnom ventilacijom javlja se najmanje 48 sati nakon endotrahealne intubacije. Najčešći uzrok pneumonije povezane sa strojnom ventilacijom je mikroaspiracija bakterija koje koloniziraju orofarinks i gornje dišne putove u teško oboljelih pacijenata. Također, bakterije tvore biofilm na endotrahealnom tubusu u kojem su zaštićene od antimikrobnih lijekova i imunološkog sustava domaćina. Najveći rizik od pneumonije povezane sa strojnom ventilacijom javlja se tijekom prvih 10 dana nakon intubacije i to kod 9 do 27 % bolesnika. Najučestaliji uzročnici su *P. aeruginosa*, *S. aureus* osjetljiv na meticilin, ali odmah nakon njih slijede *K. pneumoniae* i *E. coli* koje mogu biti i rezistentne na karbapeneme. Za odabir empirijskog antimikrobnog liječenja važno je poznavanje lokalnih stopa rezistencije. Pneumonija povezana sa strojnom ventilacijom se može prepoznati na temelju novonastalog infiltrata na radiološkoj snimci prsnog koša nakon pojave novih simptoma (npr. groznica, povećana sekrecija, pogoršanja hipoksemije) ili leukocitoze. Dijagnosticiranje je ponekad teško jer ista slika može biti uzrokovana atelektazom, plućnom embolijom ili plućnim edemom te može biti dio kliničkih nalaza kod sindroma akutnog respiratornog distresa (Kalil i sur. 2016).

Komplicirane infekcije mokraćnog sustava su jedan od najčešćih uzroka sepsa u bolnicama. Najčešći uzročnici su *E. coli* i *Klebsiella* spp. koje mogu biti i CRE, a odmah nakon njih slijedi *Pseudomonas aeruginosa*. Postoje i jednostavne mokraćne infekcije, kojima se može upravljati antibioticima, dok komplikirane, s nekoliko popratnih faktora rizika, mogu dovesti do neuspjeha liječenja, ponovljenih infekcija i smrtnosti. Stoga je važno pravilno definirati takve infekcije jer one zahtijevaju duže tretmane antibioticima. Jednostavni cistitis predstavlja infekciju mokraćnog sustava koja nastaje zbog odgovarajućih bakterija. Razlog česte pojavnosti cistitisa kod žena je taj što normalni ženski mokraćovod ima razmjerno kratku mokraćnu cijev, te stoga imaju urođenu predispoziciju za proksimalno umnažanje bakterija. Sve što nije u skladu sa spomenutim opisom smatra se komplikiranim infekcijama mokraćnog sustava koje uključuju a) infekcije koje nastaju zbog anatomskih nepravilnosti poput opstrukcije, hidronefroze, kamenca mokraćnog sustava ili kolovezikalne fistule; b) zbog imunološkog stanja (npr. primjena steroida, kemoterapija, dijabetes, starija dob); c) rekurentne infekcije, d) infekcije uzrokovane multirezistentnim mikroorganizmima; e) infekcije u trudnoći, uključujući asimptomatsku bakteriuriju; f) infekcije nastale nakon

zahvata na mokraćnom sustavu, ugradnje ureterskih stentova ili postavljanja urinarnog katetera; g) infekcije u bolesnika s transplantacijom bubrega; h) infekcije u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega; i) infekcije nakon prostatektomije i j) radioterapije. Unatoč učestalosti, komplicirane infekcije mokraćnog sustava i dalje ostaju klinički entitet koji uzrokuje problem pri propisivanju antimikrobnih lijekova te su upravo zbog toga nedavno provedene IGNITE2 i IGNITE3 studije djelotvornosti eravaciklina na ove infekcije (Sabih i Leslie 2019).

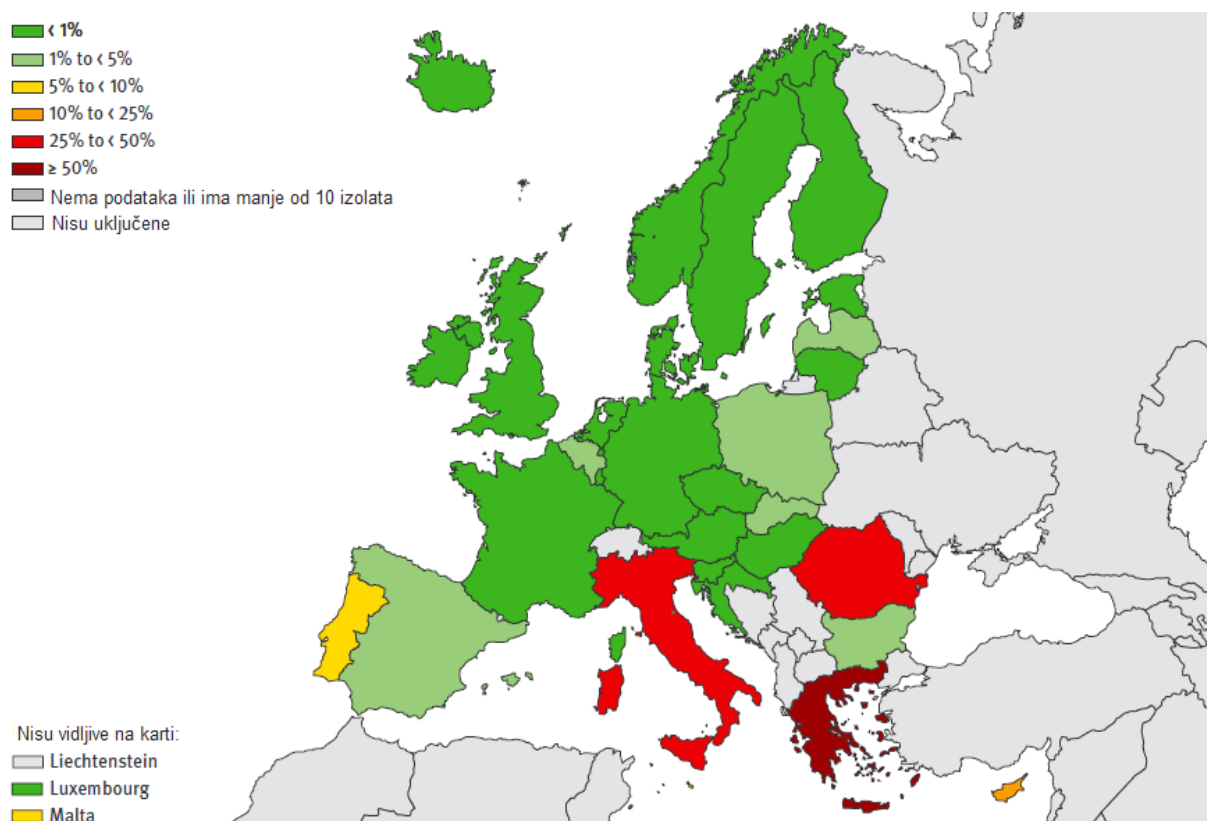
Intraabdominalne infekcije mogu uzrokovati raznolike skupine bolesti, a većina ih je rezultat upale i perforacije gastrointestinalnog trakta poput upale slijepog crijeva, peptičke ulkusne bolesti i divertikulitisa. Intraabdominalne infekcije su klasificirane kao nekomplicirane i komplicirane na temelju opsega infekcija. Nekomplicirane infekcije uključuju intramuralne upale gastrointestinalnog trakta bez anatomskih promjena. Komplicirane intraabdominalne infekcije šire se u peritonealni prostor, te su povezane s lokaliziranim ili difuznim peritonitisom. Difuzni peritonitis kategoriziran je kao primarni, sekundarni ili tercijarni peritonitis. Primarni peritonitis je također poznat kao spontani bakterijski peritonitis. Takve infekcije su obično monomikrobne te prevladavaju streptokoki dok CRE u ovom slučaju nisu toliko učestale. Sekundarni peritonitis je uzrokovan mikrobnom kontaminacijom zbog perforacije ili nekroze dijela gastrointestinalnog sustava. Konačna dijagnoza se bazira na kliničkom pregledu i anamnezi, a specifična dijagnoza se može potvrditi radiološkom obradom. Infekcije povezane sa sekundarnim peritonitisom su obično polimikrobne, a mogući uzročnici su i CRE - *E. coli*, *Enterobacter* spp. i *Klebsiella* spp. Tercijarni peritonitis predstavlja infekciju koja je postojana ili ponavljajuća najmanje 48 sati nakon prikladnog liječenja primarnog ili sekundarnog peritonitisa, a češća je među kritično bolesnima ili imunokompromitiranim pacijentima. Zbog loših mehanizama obrane domaćina, često se povezuje i s manje virulentnim organizmima, uključujući i CRE, enterokoke, stafilokoke i kandidu. Među pacijentima s intraabdominalnim infekcijom koji razviju peritonitis, kod mnogih dođe do sepse tj. teškog sustavnog upalnog odgovora na infekciju koja je povezana s akutnom disfunkcijom organa. Uspješno liječenje intraabdominalne infekcije temelji se na ranom prepoznavanju žarišta i ciljanoj antimikrobnoj terapiji, dok je kod komplicirane intraabdominalne infekcije neophodno i kirurško liječenje (Lopez i sur. 2011).



### 1.3. EPIDEMIOLOGIJA U EUROPI I HRVATSKOJ

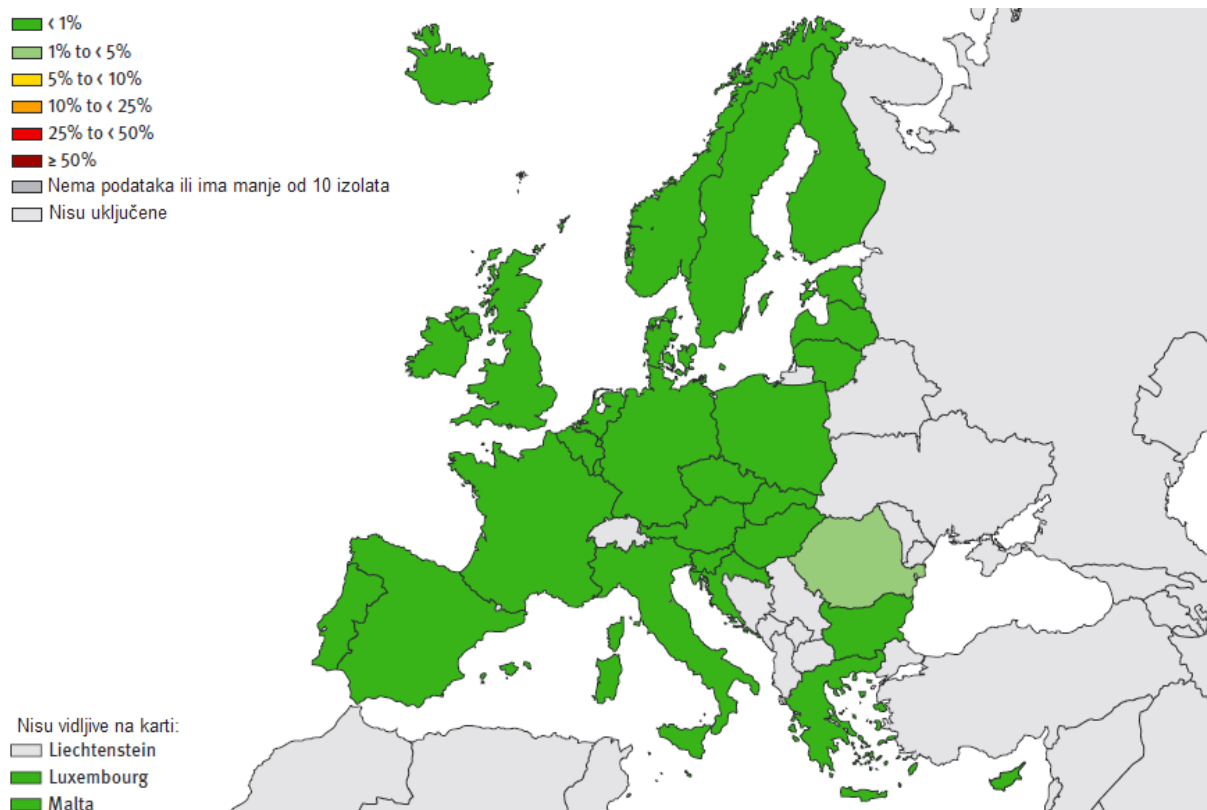
#### 1.3.1. RASPROSTRANJENOST ENTEROBAKTERIJA OTPORNIH NA KARBAPENEME U EUROPI

Rasprostranjenost CRE uglavnom se pripisuje njihovoj proizvodnji karbapenemaza i horizontalnom prijenosu kodirajućih gena posredovanih na plazmidima (Cui i sur. 2019). Za *K. pneumoniae* podaci Europske mreže za praćenje rezistencije na antimikrobne lijekove (eng. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS-Net*) za 2016. godinu pokazuju velike razlike u stopama rezistencije na karbapeneme kod invazivnih izolata u rasponu od 0 % do 66,9 % (slika 1). U Grčkoj i Portugalu uočen je rastući trend stopa rezistencije na karbapeneme kod *K. pneumoniae* u razdoblju od 2013. do 2016., dok je u Češkoj, Estoniji i Mađarskoj zabilježen pad (ECDC 2018). U Hrvatskoj u 2016. godini taj postotak i dalje nije viši od 1 % (slika 1).



**Slika 1.** Postotak invazivnih izolata *K. pneumoniae* otpornih na karbapeneme u EU/EEA zemljama za 2016. godinu. Preuzeto i prilagođeno prema radu ECDC (2018). *Napomena:* Podaci EARS-Net temelje se samo na invazivnim izolatima iz krvi i cerebrospinalne tekućine. Bakterije izolirane s drugih mjesta infekcije ili kolonizacije nisu uključene.

Za *E. coli*, podaci EARS-Neta za 2016. godinu pokazuju različitu epidemiološku situaciju, u odnosu na *K. pneumoniae*, sa znatno nižim prosječnim postotkom ponderiranog EU/EEA stanovništva (0,1 %) na karbapenemsku rezistenciju invazivnih izolata, i nacionalnim postotcima u rasponu od 0 % do 1 % (slika 2). Između 2013. i 2016. uočen je blagi pad postotka s 0,2 % na 0,1 % za EU/EEA ponderiranu populaciju, a u Hrvatskoj se situacija za *E. coli* ne razlikuje od one za *Kl. pneumoniae* te ne prelaze 1 % (ECDC 2018).



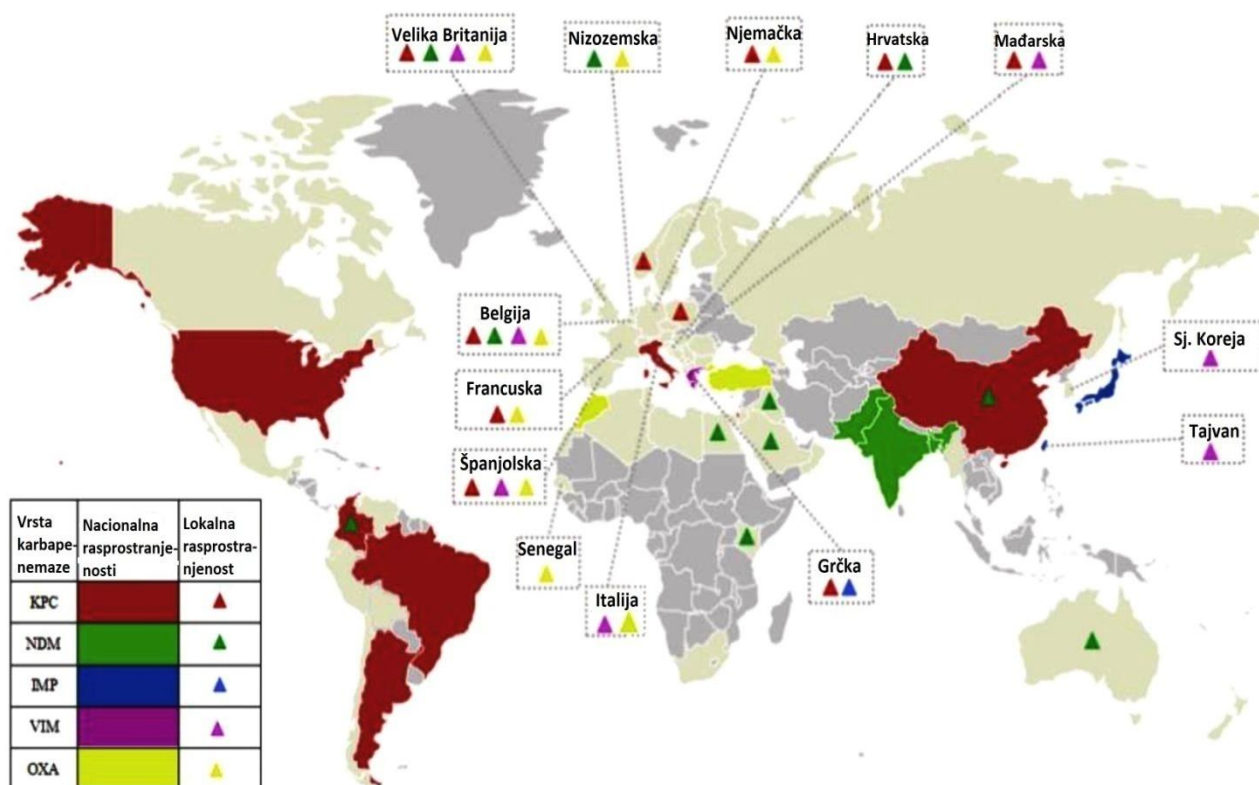
**Slika 2.** Postotak invazivnih izolata *E. coli* otpornih na karbapeneme u EU/EEA zemljama za 2016. godinu. Preuzeto i prilagođeno prema radu ECDC (2018). *Napomena:* Podaci EARS-Net temelje se samo na invazivnim izolatima iz krvi i cerebrospinalne tekućine. Bakterije izolirane s drugih mjesta infekcije ili kolonizacije nisu uključene.

Prema globalnom izvješću WHO o praćenju rezistencije na antibiotike, samo je 71 (37 %) država članica WHO uspjela prikupiti podatke o rezistenciji na karbapeneme kod *K. pneumoniae*. Zabilježena je otpornost na karbapeneme kod *K. pneumoniae* u svim regijama WHO, a veća od 50 % u dvije regije jer je 49 od 69 skupova podataka došlo iz zemalja američke i europske regije. Regije i zemlje za koje je utvrđena velika prevalencija su a) indijski potkontinent za NDM; b) SAD, Izrael, Grčka i Italija za KPC; c) Turska, Bliski Istok i d) Sjeverna Afrika za OXA-48. CRE s različitim karbapenemaznim genima pokazuju varijaciju ovisno o njihovoj zemljopisnoj rasprostranjenosti (ECDC 2018, WHO 2014).

Prevalencija CRE u velikoj mjeri ovise o zemljopisnoj regiji. Nakon otkrića, *bla<sub>KPC</sub>* naglo se proširio diljem Europe. *K. pneumoniae* je bila najčešći klinički izolirani CRE koji proizvodi KPC. Tipizacijom na osnovu multilokusnih sekvenci (eng. *Multilocus Sequence Typing*, MLST) prevladavajući tip u Kini je ST11 (eng. *Sequence Type*, ST), u Sjedinjenim Američkim Državama prevladava ST258, dok u ostalim zemljama, uključujući i Hrvatsku, prevladava ST340, ST437 i ST512. Stoga se klonalni prijenos smatra glavnim mehanizmom kojim se širi *K. pneumoniae*. Kada se gledaju europske zemlje, *K. pneumoniae* koja stvara KPC je najrasprostranjenija u Italiji te je druga najzastupljenija karbapenemaza u europskim zemljama (Cui i sur. 2019).

NDM tip karbapenemaze se uglavnom proširio u Aziji, pogotovo u Indiji, Pakistanu, Bangladešu i Kini. Zbog horizontalnog prijenosa epidemijskih plazmida širokog raspona, otkrivena je velika raznolikost *E. coli* povezane s *bla<sub>NDM</sub>*, među kojima su dominantni tipovi ST131, ST167 i ST410. Trenutno su enterobakterije koje proizvode IMP najučestalije u Japanu, na Tajvanu i Kini, a epidemije ili izvještaji o *bla<sub>IMP</sub>* u europskim zemljama su sporadični. Što se tiče VIM, Grčka je epicentar enterobakterija koje proizvode ovu karbapenemazu. Dakako, postoje značajne epidemije i u ostalim dijelovima Europe poput Velike Britanije, Belgije, Španjolske, Italije i Mađarske (Cui i sur. 2019).

Brojni pripadnici OXA postepeno su otkriveni kod CRE, uključujući OXA-23, OXA-48, OXA-40, OXA-51 i OXA-58. Najčešće  $\beta$ -laktamaze klase D su OXA-48 i u njih spadaju klasični OXA-48 i njegove inačice, OXA-181 i OXA-23. CRE koje proizvode OXA-48 su najučestalije u europskim zemljama (Francuska, Njemačka, Nizozemska, Hrvatska, Italija, Velika Britanija), ali su česte i na Bliskom Istoku (Turska) i mediteranskim zemljama, uključujući Sjevernu Afriku (uglavnom Maroko, Tunis, Egipat i Libija). Na slici 3 prikazana je globalna distribucija CRE koje proizvode različite karbapenemaze (Cui i sur. 2019). OXA-48 je najzastupljenija karbapenemaza u Hrvatskoj (Tambić-Andrašević i sur. 2019).



**Slika 3.** Globalna distribucija različitih karbapenemaza kod CPE. Karbapenemaze su se pojavile u većini regija širom svijeta. KPC-ovi su najzastupljenije karbapenemaze i uglavnom su rasprostranjene u Kini, Sjedinjenim Američkim Državama, Italiji i većinskim regijama Južne Amerike; NDM uglavnom prevladavaju u Kini, Pakistanu, Indiji i Bangladešu; IMP prevladavaju u Japanu, Tajvanu i Kini; VIM uglavnom prevladava u Grčkoj; OXA se uglavnom odnosi na OXA-48 te je rasprostranjena u Turskoj, Maroku i europskim zemljama (Francuska, Njemačka, Nizozemska, Italija, Velika Britanija). Preuzeto i prilagođeno prema radu Ciu i sur. (2019).

### 1.3.2. POTENCIJAL ZA NASTANAK EPIDEMIJE U ZDRAVSTVU I ZAJEDNICI

CRE, posebno *K. pneumoniae*, imaju visoki potencijal za izazivanje epidemije u zdravstvenim ustanovama. Takve epidemije zabilježene su u nekoliko europskih država kao što je Češka, Francuska, Njemačka, Grčka, Italija, Španjolska i Velika Britanija. Čimbenici rizika za infekciju s CRE u zdravstvenim ustanovama slični su onima s drugim multirezistentnim bakterijama. Uključuju hospitalizaciju pacijenta u jedinici intenzivnog liječenja (JIL), dugotrajni boravak u JIL-u, kritične bolesnike, primjenu invazivnih pomagala i prethodnu antimikrobnu terapiju. Nedavna meta-analiza utvrdila je da su upotreba medicinskih pomagala i upotreba karbapenema najznačajniji čimbenici rizika za stjecanje

CRE kod hospitaliziranih pacijenata. U 2011. godini ECDC (eng. *European Centar for Disease prevention and Control*) je proveo sustavni pregled učinkovitosti mjera za kontrolu infekcije radi sprječavanja širenja CRE, uz ažuriranje 2014. Sljedeće su mjere identificirane kao učinkovite:

- aktivni probir brisom rektuma pri prijemu u bolnicu, prijemu na određene odjele i tijekom epidemije;
- preventivna kontaktna izolacija prilikom prijema, higijena ruku, kohortiranje pacijenata, izolacija pacijenata, čišćenje okoline, edukacija osoblja, traženje kontakata i racionalna primjena antibiotika (ECDC 2018).

Dok je *K. pneumoniae* rezistentna na karbapeneme trenutno učestalija i vjerojatnije je da će izazvati epidemije vezane za zdravstvene ustanove, *E. coli* rezistentna na karbapeneme predstavlja veći rizik za širenje u izvanbolničkoj okolini. Sve je više dokaza da se patogena *E. coli* može prenijeti na ljude preko životinjskih namirnica. Fekalno-oralni prijenos i prijenos putem prehrambenog lanca mogu potencijalno proširiti *E. coli* otpornu na karbapeneme na veći broj zdravije i mlađe populacije. Kontaminacija prehrambenih proizvoda enterobakterijama rezistentnim na antibiotike opisana je u nekoliko europskih zemalja, na primjer kontaminacija mesa piletine ili ostale peradi u Austriji, Njemačkoj, Nizozemskoj, Italiji i Španjolskoj, a povrća u Nizozemskoj. Sada postoje dokazi da je udio *E. coli* rezistentne na cefalosporine treće i četvrte generacije podrijetlom od životinja, posebno peradi. CRE i/ili karbapenemaze sve se više otkrivaju iz izvora kao što su okoliš, hrana i životinje, uključujući svinje, perad, stoku, morsku hranu, pse, mačke, konje, ptice kućne ljubimce, lastavice, divlje svinje, divlje rode, galebove, a zabilježena je i proizvodnja karbapenemaze u patogena *Salmonella enterica*, koja se prenosi hranom (ECDC 2018).

### 1.3.3. MEĐUNARODNI ASPEKTI ZA EUROPSKE ZEMLJE I ZEMLJE TREĆEGA SVIJETA

Prijenos CRE međunarodnim transferom bolesnika ili povratkom putnika mogao bi značajno pridonijeti širenju ovih bakterija u zemljama s još uvijek niskom razinom CRE. U nekoliko europskih zemalja opisana su izbijanja CRE nakon međunarodnog transfera bolesnika koloniziranih s CRE. CRE se može unijeti u zemlje s niskom rasprostranjenošću

CRE iz europskih zemalja s visokom stopom CRE kao što su Grčka i Italija, ili iz drugih zemalja ili regija s visokim stopama CRE, npr. zemalja istočnog i južnog mediteranskog područja, indijskog potkontinenta i jugoistočne Azije (ECDC 2018).

Visoka mobilnost i globalna trgovina igraju važnu ulogu u prenošenju antimikrobne otpornosti, a visoka razina upotrebe antimikrobnih sredstava kod ljudi, životinja i poljoprivrede, u kombinaciji s lošom javnozdravstvenom infrastrukturom (neadekvatni kanalizacijski sustavi, nekvalitetna pitka voda i prenapučenost) rezultirala je visokim postocima antimikrobne otpornosti na gram-negativne bakterije. Primjer koji se često navodi je NDM CRE, za koji bi se visoki udio slučajeva dijagnosticiranih u Velikoj Britaniji mogao povezati s prethodnim putovanjima i/ili bolničkom skrbi u Indiji ili Pakistanu. Visoka stopa prijenosa enterobakterija iz probavnog trakta, koje su otporne na više lijekova, također je opisana kod putnika koji se vraćaju u Europu iz tropskih područja. Prijenos CRE prijavljen je kod putnika koji se vraćaju iz regija s visokom rasprostranjenosti CRE (ECDC 2018).

## 1.4. MOGUĆNOSTI LIJEČENJA INFEKCIJA UZROKOVANIH ENTEROBAKTERIJAMA OTPORNIMA NA KARBAPENEME

### 1.4.1. STARE I NOVE MOGUĆNOSTI LIJEČENJA

Do danas mogućnosti liječenja infekcija uzrokovanih s CRE ostaju vrlo ograničene. Polimiksini (kolistin odnosno polimiksin E) u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima, poput meropenema, se povijesno smatraju prvim izborom i osnovnom terapijom za liječenje infekcija uzrokovanih s CRE (Sheu i sur. 2019). Polimiksini djeluju kao deterdženti vanjske membrane gram-negativnih bakterija. Tigeciklin se također koristi u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje teških infekcija uglavnom na temelju povoljnih studija *in vitro* te opservacijskih iskustva (Bassetti i sur. 2019). Međutim, otpornost na polimiksine i tigeciklin se povećava. Za razliku od kolistina i tigeciklina, fosfomicin i aminoglikozidi se povremeno koriste (Sheu i sur. 2019). Aminoglikozidi su bakteriostatski antibiotici koji inhibiraju bakterijsku 30S ribosomalnu podjedinicu, a čije djelovanje ovisi o koncentraciji. Gentamicin, amikacin i tobramicin su najčešće korišteni aminoglikozidi u liječenju infekcija uzrokovanih s CRE u slučaju otpornosti na polimiksin. Fosfomicin je analog fosfoenolpiruvata koji interferira s nastajanjem uridin difosfat (UDP) N-

acetilmuramske kiseline, prekursora peptidoglikana. Njegova intravenska formulacija se koristi za liječenje CRE, često u kombinacijama s drugim lijekovima (Bassetti i sur. 2019). Karbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem) još uvijek igraju važnu ulogu u liječenju CRE infekcija, osobito kada se koriste u liječenju CRE s nižom vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), uključujući terapiju s višim dozama karbapenema, kombinacije s drugim antibioticama aktivnim protiv CRE ili primjenom dvostruke doze karbapenema. Stariji antibiotici kao što su minociklin, doksiciklin, trimetoprim/sulfametoksazol i kloramfenikol mogu biti učinkoviti za neke CRE izolate (Sheu i sur. 2019).

Zbog sve veće otpornosti, nefrotoksičnosti i suboptimalnih koncentracija, razvili su se novi antibiotici koji imaju potencijal u budućem liječenju CRE infekcija: ceftazidim/avibaktam, koji je djelotvoran na sojeve koji produciraju KPC i OXA-48, meropenem/vaborbaktam koji je aktivan protiv sojeva koji produciraju KPC, plazomicin kao aminoglikozid s aktivnošću *in vitro* protiv CRE te eravaciklin čija se djelotvornost pratila u ovom istraživanju. Iako još uvijek nedostaju izravni dokazi o uspješnosti pojedinih načina liječenja, ovi novi antibiotici pružaju dodatne terapijske mogućnosti za CRE infekcije. Tablica 3 sažima trenutno dostupne antimikrobne lijekova i njihove preporučene doze za liječenje CRE infekcija. Sve potencijalne aktivne lijekove treba testirati u uvjetima *in vitro* jer su terapijske mogućnosti ograničene. Preporučuje se odabir antimikrobnih lijekova prema podacima osjetljivosti u uvjetima *in vitro*, kliničkoj slici i svim drugim dostupnim informacijama. Veće doze mogu biti potrebne za teške infekcije kao što su pneumonija i septički šok. Mnoge anti-CRE terapije su nedavno objavljene, stoga se u tablici 4 nalazi nekoliko potencijalnih terapijskih kombinacija i novih antibiotika (Sheu i sur. 2019).

**Tablica 3.** | Antimikrobni lijekovi korišteni za CRE infekcije. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sheu i sur. (2019).

Antimikrobni lijekovi	Preporučena doza za infekcije <sup>a</sup> CRE	Komentari
Meropenem Ertapenem	2 g svakih sati putem produžene infuzije za izolate s MIK od 2–8 mg/L. Razmatranje 2 g svakih 24 sata.	Vrlo vjerojatno neučinkovit za izolate s MIK > 8 mg/L. Koristi se pri dvostrukoj terapiji karbapenemom.
Kolistin	Početna doza od 9 MU, a zatim 9 MU na dan u 2-3 podijeljene doze.	
Polimiksin B	Početna doza od 2–2.5 mg/kg, a potom 5 mg/kg u dvije podijeljene doze.	
Tigeciklin	Početna doza od 100 mg, a potom 50 mg svakih 12 sati.	Razmatranje početne doze od 200 mg, a potom 100 mg svakih 12 sati for teške infekcije. Odobreno od strane FDA u kolovozu 2018. za liječenje cIAI. Djelotvornost protiv CRE je demonstrirana <i>in vitro</i> . Još uvijek nema kliničkih podataka za infekcije CRE.
Eravaciklin	1 mg/kg svakih 12 sat.	Koristi se u kombinacijskim terapijama. Razmatra se povišena doza od 10–15 mg/kg dnevno za teške infekcije kada nema drugih opcija. Moguće je da se rizik toksičnosti poveća. Preporučuje se TDM.
Gentamicin Tobramicin	5–7 mg/kg na dan.	Koristi se u kombinacijskim terapijama. Razmatra se povišena doza od 25–30 mg/kg dnevno za teške infekcije kada nema drugih opcija. Moguće je da se rizik toksičnosti poveća. Preporuča se TDM.
Amikacin	15–20 mg/kg na dan.	Odobren od strane FDA u lipnju 2018. za liječenje cUTI uključujući pijelonefritis. Demonstrirana je djelotvornost <i>in vitro</i> je protiv ESBL i enterobakterija koje proizvode karbapenemaze (CAP, eng. <i>carbapenemase-producing Enterobacteriaceae</i> ), ali kliničkih podataka za CRE infekcije i dalje manjka.
Plazomicin Fosfomicin	15 mg/kg na dan. 4 g svakih 6 sati do 8 g svakih 8 sati.	Koristi se u kombiniranoj terapiji. Proizvođači MBL su osjetljivi, osim ako nisu proizvođači ESBL ili AmpC.
Aztreonam	1–2 g svakih 8 sati.	Proizvođači OXA-48 su osjetljivi, osim ako nisu proizvođači ESBL ili AmpC.
Ceftazidim Ceftazidim/avibactam Meropenem/vaborbaktam	1–2 g svakih 8 sati. 2.5 g (2 g/0.5 g) svakih 8 sati. 2 g (1 g/1 g) svakih 8 sati.	Često su osjetljivi proizvođači KPC i OXA-48. Često su osjetljivi proizvođači KPC.

cIAI, eng. *complicated intraabdominal infection*; CRE, eng. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* cUTI, eng. *complicated urinary tract infection*; ESBL, eng. *extended-spectrum –lactamase*; KPC, eng. *K. pneumoniae carbapenemase*; MBL, eng. *metallo-lactamase*; MU, eng. *measurement unit*; OXA, eng. *oxacillinase*; TDM, eng. *therapeutic drug monitoring*.

<sup>a</sup>Za bolesnike s normalnom funkcijom bubrega.



**Tablica 4.** Potencijalne kombinacije terapijskih strategija i novi antibiotici za liječenje enterobakterija otpornih na karbapenem. Preuzeto i prilagođeno prema radu Sheu i sur. (2019).

---

**Kombinacije terapijskih strategija**

---

Visoke doze tigeciklina

Visoke doze produljene infuzije karbapenema

Dvostruka terapija karbapenemom

**Novi antibiotici**

Ceftazidim/avibaktam

Meropenem/vaborbaktam

Plazomicin

Eravaciklin

**Novi antibiotici u razvoju**

Imipenem/cilastatin i relebaktam

Cefiderokol

---

Prva potencijalna strategija je povećanje doze antimikrobnih lijekova za CRE. Visoke doze karbapenema, kolistina, i tigeciklina su povezane s boljim kliničkim ishodima infekcija uzrokovanih s CRE. Druga potencijalna strategija je kombinacija CRE antimikrobnih lijekova, iako velike opservacijske studije i sustavni pregledi sugeriraju da kombinirana terapija može biti korisna za bolesnike s teškim infekcijama CRE, kvalitetnih dokaza je malo zbog značajnih heterogenosti u dizajnu studija i populaciji bolesnika. Nedavna randomizirana kontrolna studija nije pokazivala prednosti kombinirane terapije kolistina s meropenemom u usporedbi s monoterapijom kolistinom. Rasprava o tome trebaju li se ti agensi koristiti u kombinaciji ili ne, će se zasigurno nastaviti. Kombinaciju dvaju karbapenema s infuzijom tapenema prije infuzije visoke doze meropenema ili doripenema usvojen je kao *salvage* terapija kritično bolesnih pacijenata s CRE infekcijama. Studije ukazuju da kombinacija kolistina ili tigeciklina s kombinacijom karbapenema može biti pogodna strategija za ozbiljne CRE infekcije. Nedavno uvođenje novih inhibitora  $\beta$ -laktamaza (avibaktam, vaborbaktam i relebaktam) osigurava dodatne terapijske mogućnosti za teže CRE infekcije. No treba obratiti pažnju da novi inhibitori  $\beta$ -laktamaza nisu aktivni protiv svih karbapenemaza. Avibaktam inhibira KPC i OXA-48, dok vaborbaktam i relebaktam inhibiraju samo KPC. Aminoglikozid

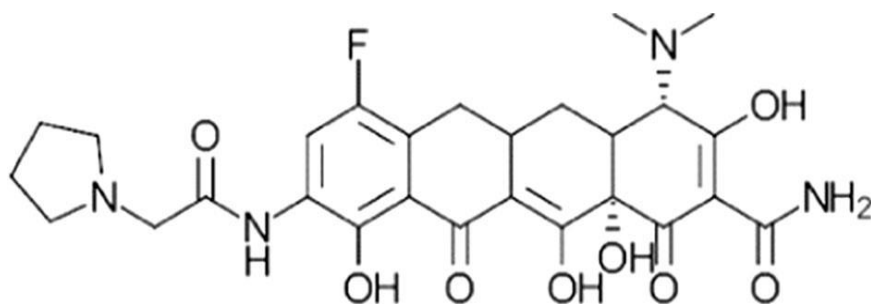
plazomicin i potpuno sintetski tetraciklinski antibiotik eravaciklin, čija se djelotvornost ispituje u ovom istraživanju, su nedavno odobreni od strane FDA, što može pružiti alternativne terapijske opcije za CRE infekcije (Sheu i sur. 2019).

#### 1.4.2. POVIJEST TETRACIKLINSKIH ANTIBIOTIKA

Razvoj tetraciklinskih antibiotika započeo je otkrićem klortetraciklina u četrdesetim godinama 20. stoljeća. Tek početkom 1950-ih je identificirana jezgra s četiri prstena, i tada je imenovan razred tetraciklina. Prvi od njih, tetraciklin, imao je veću djelotvornost, veću stabilnost i nižu učestalost gastrointestinalnih nuspojava u usporedbi sa svojim prethodnicima. Mogućnost i sposobnost modificiranja bočnih lanaca, vezanih za tetraciklinsku jezgru, kako bi se proizveli novi spojevi, bila je prekretnica za razvoj druge generacije semisintetskih tetraciklina, uključujući doksiciklin i minociklin. Razvoj minociklina početkom 1970-ih zaslužan je za mnogo širi spektar djelotvornosti, međutim, ovaj spoj također je značio kraj razvoja tetraciklina za nekoliko desetljeća. Otprilike u isto vrijeme kada je otkriven minociklin, otkriveni su i mehanizmi otpornosti na tetraciklin. Prvo su se identificirane efluks pumpe koje uklanjaju molekule lijeka iz stanice, a zatim su otkriveni mehanizmi za ribosomalnu zaštitu koji smanjuju vezanje tetraciklina za ribosome. Ova otkrića dovode do razvoja tigeciklina početkom 2000-ih. Tigeciklin je glicilciklinski antibiotik nazvan prema podjedinici glicina pričvršćenoj na bazičnu strukturu. Djelotvoran je na osjetljive i multirezistentne organizme, ali njegova upotreba ograničena je zbog nekoliko čimbenika, uključujući visoku stopu gastrointestinalnih nuspojava. U 2018. godini odobrena su dva nova tetraciklina: eravaciklin i omadaciklin. Slično kao tigeciklin, eravaciklin i omadaciklin su dizajnirani tako da specifično djeluju protiv organizama koji su otporni na tetraciklin. Omadaciklin je odobren za liječenje bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom i akutnim infekcijama kože i mekih tkiva. Eravaciklin je odobren za liječenje kompliciranih intraabdominalnih infekcija i ima širok spektar djelotvornosti koji uključuje CRE, *Stenotrophomonas maltophilia*, *A. baumannii*, MRSA, vankomicin-rezistentne enterokoke (VRE), anaerobne organizme itd. (Heaney i sur. 2019).

### 1.4.3. ERAVACIKLIN

Kao i ostali tetraciklini, eravaciklin ulazi u gram-negativne bakterijske stanice putem porinskih kanala i visokim afinitetom se reverzibilno veže za 30S ribosomsku podjedinicu. Vežanjem na primarno (Tet1) i/ili sekundarno (Tet2) mjesto na ribosomu, sprječava vezanje aminoacil-tRNA na mRNA-ribosomski kompleks te tako ima bakteriostatski učinak inhibirajući sintezu proteina. Eravaciklin se razlikuje od prethodnih generacija tetraciklina i tigeciklina po tome što je potpuno sintetički fluorociklinski spoj jer sadrži modificirani atom fluora na poziciji C7 i pirolidinoacetamido skupinu na svom D-prstenu na poziciji C9 (slika 4) što bi trebalo pospješiti njegovu djelotvornost s obzirom na nekoliko identificiranih mehanizama rezistencije na tetracikline. Dok su neki organizmi poput "MP3" skupine (*Morganella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., i *Providencia* spp.) prirodno otporni na tetracikline zbog kromosomski posredovane efluks pumpe, mnogi drugi organizmi su razvili otpornost na tetracikline genetskim modifikacijama. Najčešći od ovih mehanizama otpornosti su efluks pumpe kodirane *tet* genima. TetA efluks pumpa obično uzrokuje otpornost na tetraciklin, minociklin i doksiciklin u gram-negativnih organizama kao što je to slučaj kod CRE, dok tetK i tetL uzrokuju otpornost kod gram-pozitivnih organizama. Proteini koji štite ribosome su još jedan mehanizam otpornosti, omogućujući kontinuirani proces translacije u prisutnosti molekule tetraciklina. Sa svojim modificiranim D-prstenom, eravaciklin je dizajniran tako da na njega ne utječu navedeni mehanizmi otpornosti (Heaney i sur. 2019).



**Slika 4.** Kemijska struktura eravaciklina. Preuzeto i prilagođeno prema radu Lee i Burton (2019).

Eravaciklin je visoko biološki raspoloživ nakon oralne primjene, ima visoku metaboličku stabilnost i rijetke potencijalne interakcije s drugim lijekovima. Provedena su četiri klinička ispitivanja eravaciklina faze tri u liječenju kompliciranih intraabdominalnih i kompliciranih infekcija mokraćnog sustava s dobrim rezultatima za komplicirane intraabdominalne i suboptimalnim za komplicirane infekcije mokraćnog sustava (Bassetti i sur. 2019). Eravaciklin je dostupan kao intravenska (iv.) infuzija u dozi od 1 mg/kg svakih 12

sati, a oralna formulacija je, unatoč predviđenoj visokoj biološkoj raspoloživosti, zbog suboptimalnih rezultata studija za komplicirane infekcije mokraćnog sustava, trenutno obustavljena. Eravaciklin je uglavnom metaboliziran s CYP3A4 i FMO-posredovanom oksidacijom. Dakle, interakcija lijekova bi se trebale uzeti u obzir pri primjeni terapije kada se primjenjuje istodobno s jakim CYP3A4 induktorom rifampinom te se tada preporučuje povećanje doze do 1,5 mg/kg iv. svakih 12 sati. Kada se daje istovremeno s jakim CYP3A4 inhibitorom itrakonazolom, nisu preporučene prilagodbe doze. Nedavna studija pokazala je da postoji sistemska akumulacija, ali tijekom 10 dana najveća količina akumulacije bila je 45 % nakon standardnog doziranja. Najčešći štetni učinci koji se primjećuju tijekom uporabe eravaciklina u kliničkim studijama bile su reakcije na mjestu infuzije (7,7 %), mučnina (6,5 %), povraćanje (3,7 %) i proljev (2,3 %), a kontraindikacija za primjenu je samo u bolesnika s poznatom preosjetljivošću na lijek ili na neki drugi tetraciklinski antibiotik (Heaney i sur. 2019, Lee i Burton 2019).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

### OPĆI CILJ:

Ispitati djelotvornost eravaciklina na CRE u uvjetima *in vitro* i dokazati da je djelotvornost eravaciklina u uvjetima *in vitro* različita s obzirom na vrstu karbapenemaze koju CRE stvaraju.

### SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti osjetljivost CRE na eravaciklin metodom disk difuzije i E-testa.
2. Napraviti molekularnu karakterizaciju CRE utvrđivanjem gena za produkciju 4 različite vrste karbapenemaza – KPC, VIM, NDM i OXA-48.
3. Odrediti djelotvornost eravaciklina *in vitro* s obzirom na tip karbapenemaze koju CRE stvaraju - grupe A (KPC), grupe B (metalo-beta-laktamaze VIM i NDM), i grupe D (OXA-48).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. BAKTERIJSKI SOJEVI

U istraživanju su se koristili bakterijski sojevi CRE izolirani iz kliničkih uzoraka bolesnika Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb), uzeti tijekom rutinskih dijagnostičkih pretraga u 2018. godini. Prikupljeno je 80 sojeva CRE od kojih 8 sojeva *E. coli*, 43 soja *K. pneumoniae*, 5 sojeva *K. oxytoca*, 12 sojeva *E. cloacae* i 12 sojeva *C. freundii*. Izolati su uzeti iz kliničkih uzoraka urina, stolice, rektuma, briseva rana, ždrijela, uretre, nosa, perianalog područja, te aspirata traheje i hemokulture te je jedan uzorak bio intraoperativni (tablica 5). Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Zagreb.

Bakterijski sojevi identificirani su MALDI-TOF masenom spektrometrijom (Biotyper, Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Njemačka). Za identifikaciju MALDI-TOF masenom spektrometrijom korišten je direktni transfer iz 24-satne kulture. Nakon nanošenja na pločicu i sušenja, nanešen je 1 µL HCCA ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicinaminska kiselina) matriksa. HCCA matriks je prethodno priređen dodavanjem 250 µL standardnog otapala (acetonitril 50 %, voda 47,5 % i trifluorocena kiselina 2,5 %; Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, UK), u originalnu HCCA matriks epruvetu (Biotyper, Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Njemačka). Nakon sušenja, pločica je stavljena u MALDI-TOF maseni spektrometar radi očitavanja rezultata. Rezultati dobiveni u obliku *score-a* interpretirani su prema uputi proizvođača: iznad 2.000 identifikacija na razini vrste; od 1.700 do 1.999 identifikacija na razini roda; i < 1.700 bez pouzdane identifikacije.

**Tablica 5.** Lista bakterijskih sojeva i klinički uzorci iz kojih su izolirani.

	Sojevi	Uzorak
1.	<i>Escherichia coli</i>	Urin
2.	<i>Escherichia coli</i>	Stolica
3.	<i>Escherichia coli</i>	Rektum
4.	<i>Escherichia coli</i>	Rana
5.	<i>Escherichia coli</i>	Rektum
6.	<i>Escherichia coli</i>	Urin
7.	<i>Escherichia coli</i>	Rektum
8.	<i>Escherichia coli</i>	Rektum
9.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ždrijelo
10.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aspirat traheje

11.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Stolica
12.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aspirat traheje
13.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
14.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Stolica
15.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
16.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
17.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Uretra
18.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
19.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
20.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rana
21.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
22.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
23.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
24.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Uretra
25.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
26.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
27.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
28.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
29.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nos
30.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
31.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	aspirat traheje
32.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
33.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	bris uretre
34.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Perianalni
35.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aspirat traheje
36.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
37.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
38.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
39.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ždrijelo
40.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Stolica
41.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rana
42.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
43.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
44.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
45.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
46.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Stolica
47.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
48.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
49.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Uretra
50.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rektum
51.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urin
52.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Urin
53.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	HK
54.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Stolica
55.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Stolica
56.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Stolica
57.	<i>Enterobacter cloacae</i>	aspirat traheje
58.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Stolica
59.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rektum
60.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Stolica
61.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Intraop. uzorak

62.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urin
63.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urin
64.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Aspirat traheje
65.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urin
66.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sputum
67.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urin
68.	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rana
69.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
70.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
71.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
72.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
73.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
74.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
75.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
76.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
77.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
78.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica
79.	<i>Citrobacter freundii</i>	Rektum
80.	<i>Citrobacter freundii</i>	Stolica

### 3.2. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE POMOĆU METODE PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE

U 1 mL sterilne destilirane vode sterilnom ezom se umiješalo nekoliko kolonija 24-satne čiste kulture CRE, koja se dobro izvorteksirala i inkubirala 10 minuta na temperaturi od 98° C u termobloku (StarLab; Milton Keynes, UK) kako bi došlo do lize bakterijskih stanica. Nakon centrifugiranja (Centriuga Eppendorf 5424 (Eppendorf; Hamburg, Njemačka)) u trajanju od jedne minute na 11000 g, odvojen je supernatant u novu mikroeprijetu i korišten za PCR reakciju. Reakcijska smjesa sastoji se od PCR mastermix-a (Roche Diagnostics; Risch-Rotkreuz, Švicarska), para početnica, sterilne destilirane vode i izolirane DNA, s ukupnim volumenom reakcijske smjese 50 µL, u sljedećim omjerima:

- ✓ PCR mastermix                                  25 µL
- ✓ Početnica F (konc. 10 µM)                  2 µL
- ✓ Početnica R (konc. 10 µM)                  2 µL
- ✓ sterilna destilirana voda                      16 µL
- ✓ DNA    5 µL



PCR mastermix sadržavao je 25 U Taq DNA polimeraze u 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix (svaki po 0.4 mM, konačni pH 8,3). Početnice za umnažanje gena (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, UK), koji kodiraju za četiri različite vrste karbapenemaze, su navedene u tablici 6. Uvjeti za amplifikaciju jednaki su za sve četiri vrste početnica: početna denaturacija: 95°C/5 minuta, 25 ciklusa; denaturacija: 95°C/30 sekundi, pripajanje početnica: 55°C/30 sekundi, elongacija: 72°C/30 sekundi; završna elongacija: 72°C/7 minuta.

**Tablica 6.** Geni za detektiranje pojedine karbapenemaze, F (eng. *forward*) i R (eng. *reverse*) početnice za umnažanje gena i veličina umnoženog produkta.

R i F početnice	Naziv gena	Sekvenca početnica u smjeru 5'-3'	Veličina produkta (pb)
F <sub>KPC</sub> R <sub>KPC</sub>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC TGT CAC TGT ATC GCC GTC	798
F <sub>NDM</sub> R <sub>NDM</sub>	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	AAT GGA ATT GCC CAA TAT TAT GC CGA AAG TCA GGC TGT GTT GC	621
F <sub>VIM</sub> R <sub>VIM</sub>	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	CAG ATT GCC GAT GGT GGT TGG AGG TGG GCC ATT CAG CCA GA	390
F <sub>OXA-48</sub> R <sub>OXA-48</sub>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	438

Agarozna gel elektroforeza napravljena je nanošenjem produkta PCR na 2 %-tni agarozni gel koji se sastoji od 2 g agaroze (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, UK) i 100 mL 1xTAE pufera. Agarozna je otopljena u puferu na oko 60 °C i izlivena na nosač. Nakon 20 minuta polimerizirani gel se može uroniti u kadicu za elektroforezu (PowerPac Basic (Bio-Rad; Hercules, SAD)) s 1xTAE puferom. Kao otopina za obilježavanje PCR produkta koristi se „gel loading solution“ (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, UK) koja sadrži 0,05 % bromfenolnog plavila, 40 % saharoze, 0,1 M EDTA i 0,5 % natrij lauril-sulfata (SDS). U jažice se nanosio i DNA marker raspona molekularne mase 100-1500 pb (Roche Diagnostics; Risch-Rotkreuz, Švicarska) kako bi se mogla odrediti veličina pojedinog produkta. Elektroforeza se odvija na 80-100 V i traje jedan sat. Rezultate očitavamo pod UV svjetlom tako što se gel inkubira u otopini etidijevog bromida (Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, UK) nekoliko minuta te potom stavi na transiluminator (Cleaver Scientific; Rugby, UK).

### 3.3. ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI METODOM DISK DIFUZIJE I E-TESTA

Osjetljivost bakterijskih sojeva ispitivala se metodom disk difuzije i određivanjem MIK vrijednosti E-testom. Disk difuzija se izvodila pomoću diskova eravaciklina jačine 20 µg (Liofilchem s.r.l.; Roseto degli Abruzzi, Italija), a MIK pomoću E-testova (Liofilchem s.r.l.; Roseto degli Abruzzi, Italija) prema uputi proizvođača na Mueller-Hinton agaru (Oxoid; UK). Prethodno odabrani sojevi enterobakterija, pohranjenih na 4 °C, nasađivali su se na krvni agar i inkubirali preko noći na 37 °C. Bakteriološkom ušicom se uzmu dvije do tri kolonije iz prekonoćne kulture koje se razmute u 2 mL fiziološke otopine i potom se stavljaju na vorteks kako bi se trešnjom dobila homogena suspenzija. Gustoća suspenzije podese se prema standardnoj 0,5 McFarland suspenziji (0,5 McFarlanda se približno slaže s  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL za *E. coli*). Suspenzije testiranih sojeva se nanose u tri sloja, okrećući petrijevku otprilike za 60 stupnjeva svaki put kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela inokuluma. Treba pustiti da se višak vlage apsorbira tako da je površina potpuno suha prije primjene E-testnih trakica i diskova. Na površinu Mueller-Hinton agara se nanese jedna E-testna trakica i jedan difuzijski disk eravaciklina mjerilom okrenutim prema gore, pritišćući ih sterilnom pincetom na površini agara da bi se osiguralo da je antibiotik u potpunom kontaktu s površinom agara. Petrijevke se potom inkubiraju preko noći na  $35 \pm 2$  °C. Nakon inkubacije eravaciklin se procesom difuzije proširio po površini agara, stvori se gradijent koncentracije te soj na određenoj udaljenosti od ruba diska prestaje rasti, ovisno o osjetljivosti. Nakon inkubacije se mjeri sam promjer inhibicijske zone (područje oko diska gdje bakterije nisu narasle) u milimetrima te se rezultat interpretira tako da se svaki promjer veći ili jednak ( $\geq$ ) od 15 mm bilježio kao osjetljiv soj. Za E-testne trakice eravaciklina se promatra gdje relevantna elipsa inhibicije siječe trakicu i očitava se MIK vrijednost pri potpunoj inhibiciji. Rast duž cijelog gradijenta, tj. nedostatak elipse inhibicije, pokazuje da je vrijednost veća ili jednaka ( $\geq$ ) najvećoj vrijednosti na skali. Elipsa inhibicije koja se siječe ispod donjeg kraja ljestvice očitava se kao manja ( $<$ ) od najniže vrijednosti. MIK od 0,125 µg/mL smatra se istim kao i 0,12 µg/mL za potrebe izvještaja, a svaki rezultat koji je manji ili jednak ( $\leq$ ) 0,5 µg/mL se smatrao osjetljivim sojem. Stoga se ukratko može reći da su se rezultati interpretirali na temelju širine inhibicijske zone za disk difuziju, a za E-test na temelju toga gdje nastala elipsa siječe E-testnu trakicu eravaciklina. Potom se odredilo je li određeni ispitivani soj osjetljiv (eng. *sensitive*, S), intermedijaran (engl. *intermediate*, I) ili rezistentan (eng. *resistant*, R). S obzirom na to da European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

ima samo interpretativne kriterije za MIK *E. coli*, dok za disk difuziju i ostale enterobakterije nema interpretativnih kriterija, rezultati disk-difuzije i E-testa interpretirat će se prema FDA kriterijima. Za kontrolu kvalitete koristit će se kontrolni soj *E. coli*, ATCC® 25922.

### 3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza uključivala je metode deskriptivne statistike i Fisher-ov egzaktni test ( $P < 0,05$ ).

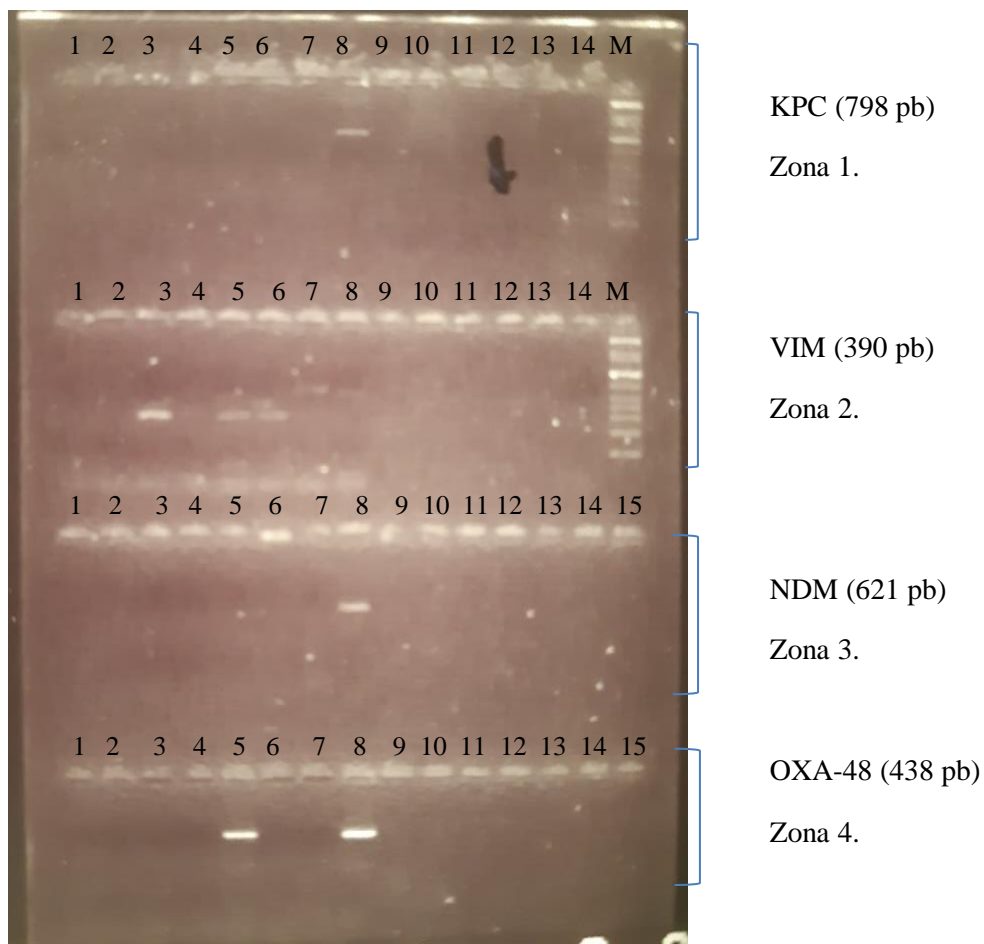
## 4. REZULTATI

### 4.1. IDENTIFIKACIJA SOJEVA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

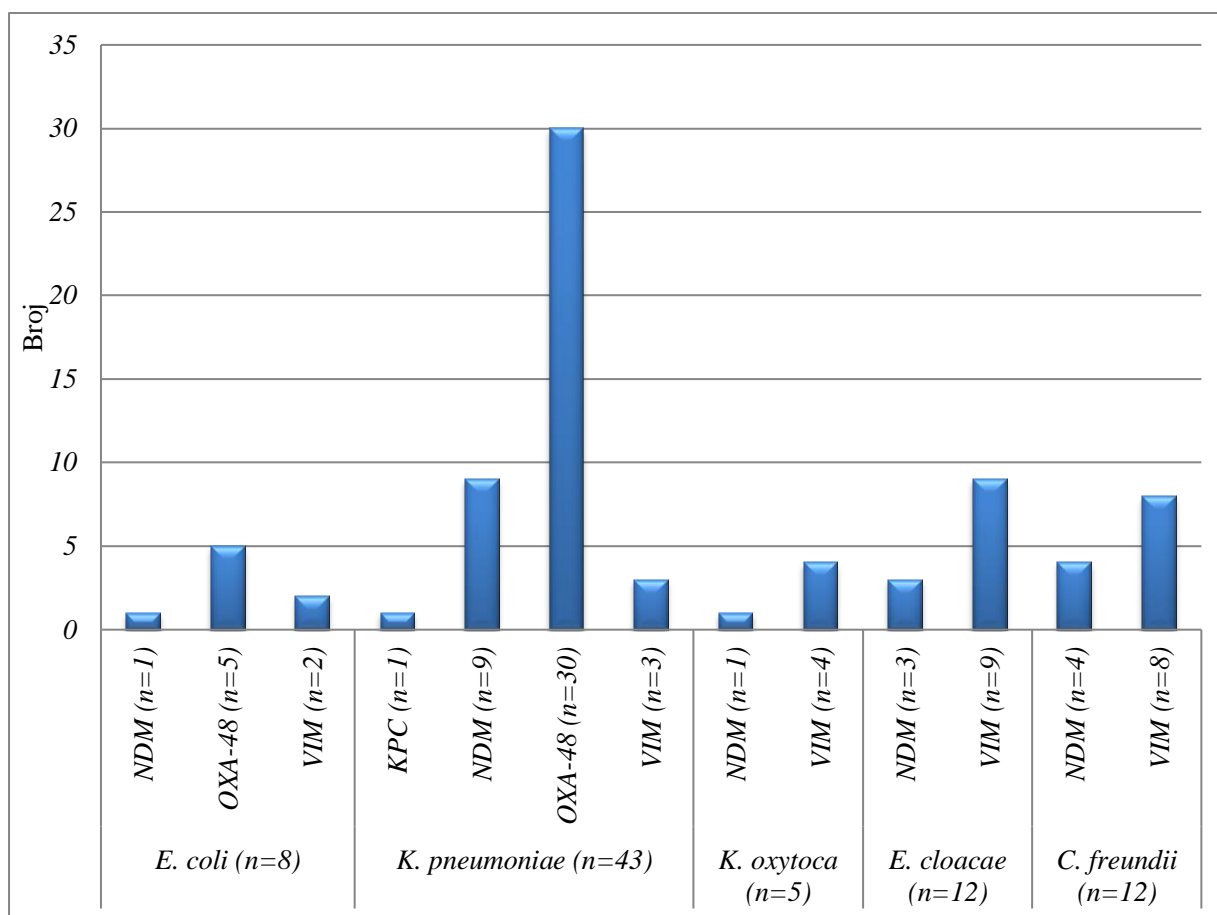
Rezultati dobiveni masenom spektrometrijom MALDI-TOF u obliku *score-a* interpretirani su prema uputi proizvođača: identifikacija na razini vrste, 1.700–1.999 identifikacija na razini roda i < 1.700 bez pouzdane identifikacije. Za sve bakterijske sojeve MALDI-TOF masena spektrometrija dala je pouzdane rezultate identifikacije na razini vrste sa *score-om*  $\geq 2.000$ . Bakterijski sojevi i klinički uzorci iz kojih potječu prikazani su u tablici 5.

### 4.2. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA KARBAPENEMAZE UZ POMOĆ METODE PCR I AGAROSNE GEL ELEKTROFOREZE

Nakon provedbe umnažanja DNA za pojedine gene koji kodiraju za karbapenemaze metodom PCR, produkti su se detektirali pomoću agarosne gel elektroforeze i vizualizirali pomoću UV transiluminatora. Od ukupno 80 analiziranih uzoraka jedan je KPC pozitivan soj, 18 je NDM, 35 OXA-48 i 26 VIM pozitivnih izolata (slika 5). Utvrđeno je da, od 8 sojeva *E. coli*, jedan proizvodi NDM, 5 OXA-48 i 2 VIM karbapenemazu dok je za *K. pneumoniae* zabilježeno da jedan soj stvara KPC, 9 sojeva stvara NDM, 30 sojeva OXA-48 i 3 soja VIM. Od 5 izolata *K. oxytoca*, jedan proizvodi NDM, a 4 VIM karbapenemazu; dok od 12 sojeva *E. cloacae* i isto toliko *C. freundii*, 3 proizvode NDM i 9 VIM, odnosno 4 proizvode NDM, a 8 VIM (slika 6).



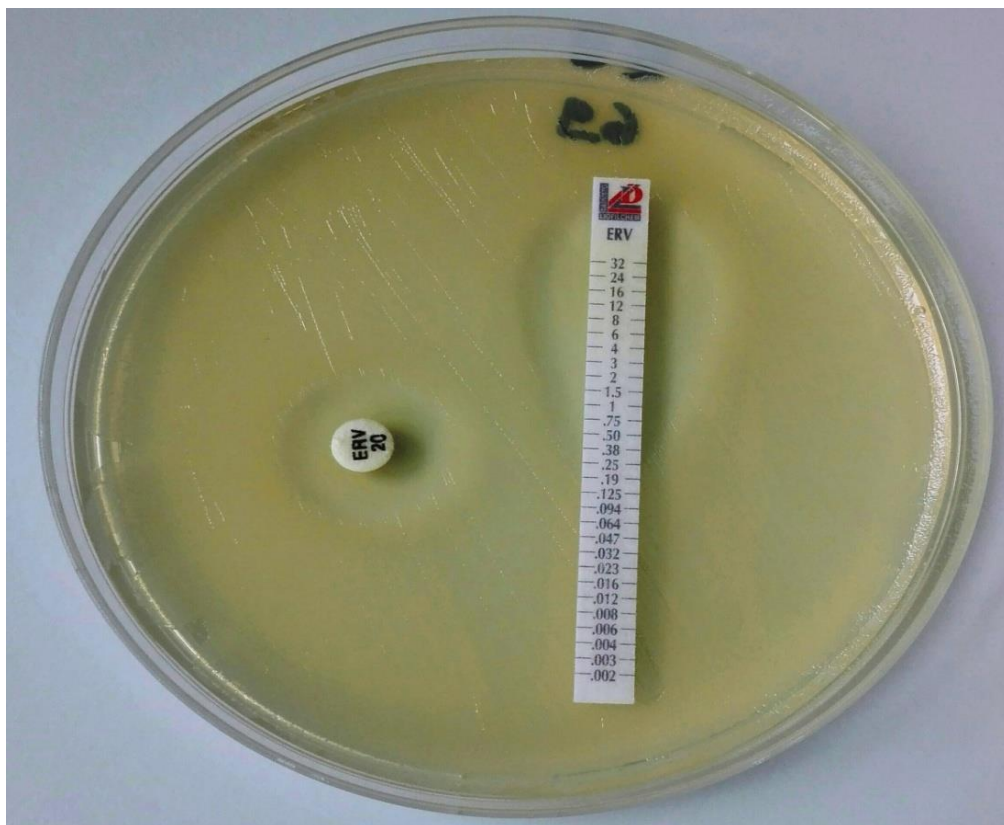
Slika 5. Agarozna gel elektroforeza s prikazom rezultata za detekciju PCR produkata četiri različite vrste karbapenemaza kod 13 izolata i pozitivne kontrole: 1. zona – KPC: pozitivna kontrola u jažici 8; 2. zona – VIM: pozitivan izolat u jažici 7, pozitivna kontrola u jažici 8; zona 3. – NDM: pozitivna kontrola u jažici 8; 4. zona – OXA-48: pozitivan izolat u jažici 5, pozitivna kontrola u jažici 8. U zadnjoj jažici se nalazi molekularni marker (M) raspona 100 -1500 pb.



**Slika 6.** Prikaz vrsta i broja (n) pojedinih ispitivanih bakterijskih sojeva te vrsta i broja (n) karbapenemaza koje proizvode.

#### 4.3. ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI METODOM DISK DIFUZIJOM I E-TESTOM

Na istih 80 kliničkih izolata se ispitivala djelotvornost eravaciklina u uvjetima *in vitro* pomoću disk difuzije tako što se izmjeri promjer zone inhibicije, te metodom E-testa mjerenjem MIK-a kako je prikazano na slici 7.

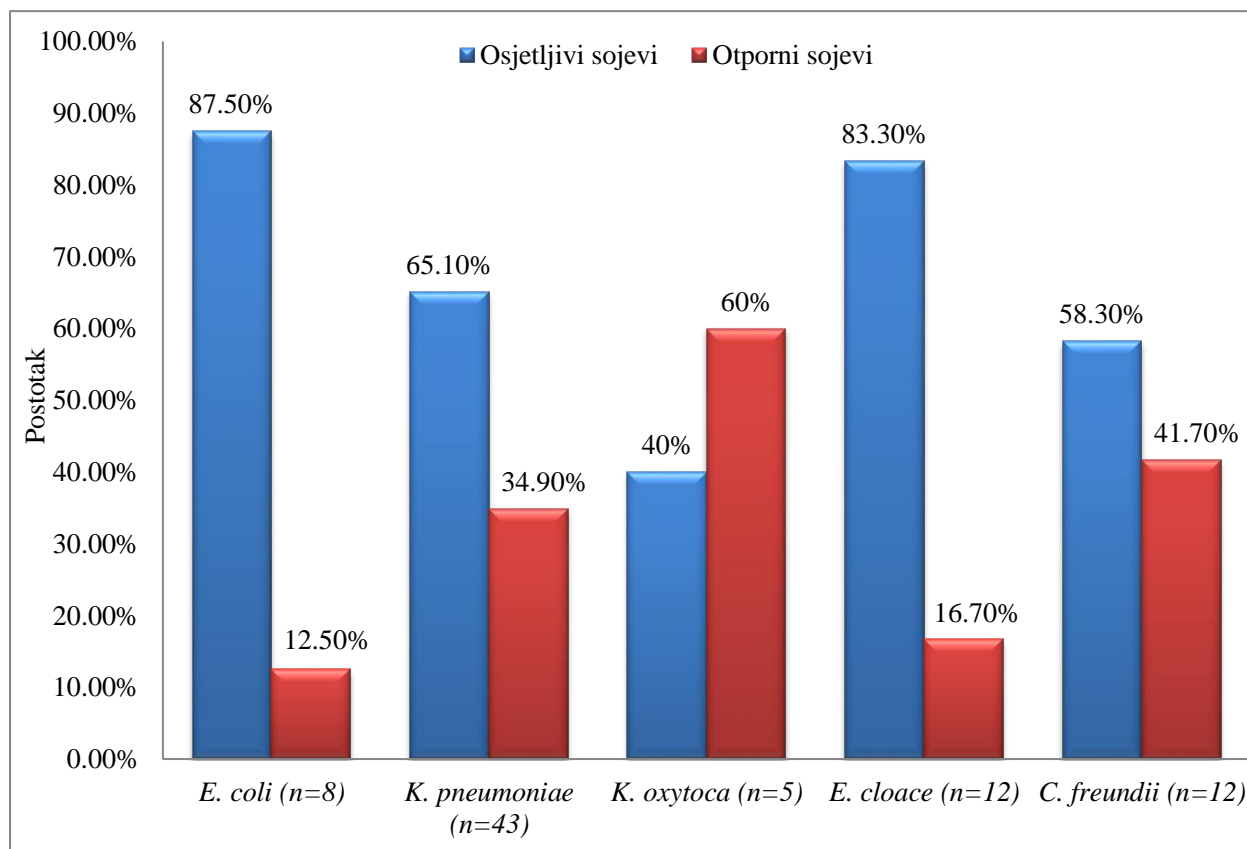


**Slika 7.** Rezultati disk difuzijskog testa (lijevo) i E-testa (desno) gdje se očitavala djelotvornost eravaciklina na enterobakterije rezistentne na karbapeneme (CRE). Ispitivani CRE soj na ovoj slici je osjetljiv na eravaciklin što potvrđuje veličina zone inhibicije ( $\geq 15$  mm) i vrijednost MIK-a ( $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Valja naglasiti da je osjetljivost sojeva mjerena metodom disk difuzije i E-testa u 100 %-tnoj korelaciji tj. da su 54 soja (67,5 %) osjetljiva na eravaciklin, dok je preostalih 26 sojeva (32,5 %) otporno na eravaciklin. Svaki od ispitivanih bakterijskih sojeva proizvodi određenu vrstu karbapenemaze.

Slika 8 prikazuje postotak osjetljivosti 8 sojeva *E. coli*, 43 soja *K. pneumoniae*, 5 sojeva *K. oxytoca*, 12 sojeva *E. cloacae* i 12 sojeva *C. freundii*. 87, 5 % (7/8) sojeva *E. coli*, 83, 3 % (10/12) *E. cloacae*, 65,1 % (28/43) izolata *K. pneumoniae*, 58, 3 % (7/12) sojeva *C. freundii*, 40 % (2/5) izolata *K. oxytoca* je osjetljivo na eravaciklin. Iz ovih podataka se zasigurno može reći da najveću osjetljivost pokazuju sojevi *E. coli*, koji većinski proizvode OXA-48 (slika 9). Izrazito veliku osjetljivost na eravaciklin pokazuje i izolati *E. cloacae* od kojih njih 75 % (9/12) proizvodi VIM (slika 9). Nešto manju osjetljivost pokazuju sojevi *K. pneumoniae* s 34,9 % (15/43) sojeva koji su otporni na eravaciklin, a odmah iza toga slijedi *C. freundii* s

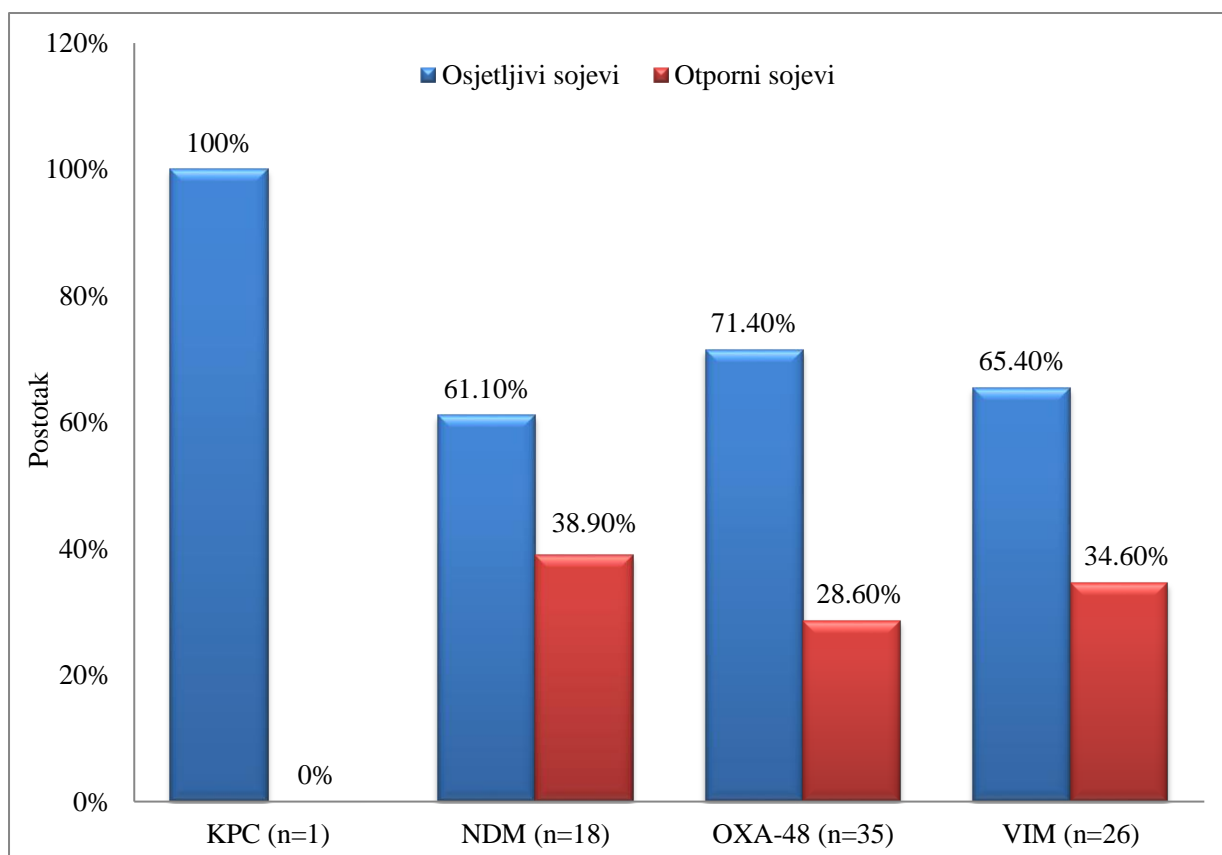
41,7 % (5/12) sojeva otpornih sojeva. Zabrinjavajuću otpornost pokazuju sojevi *K. oxytoca* od kojih 80 % (4/5) sojeva proizvodi VIM, a od toga 75 % (3/5) sojeva pokazuje otpornost.



**Slika 8.** Prikaz postotka osjetljivih i otpornih CRE na eravaciklin s obzirom na bakterijsku vrstu gdje n predstavlja broj sojeva pojedine bakterijske vrste.

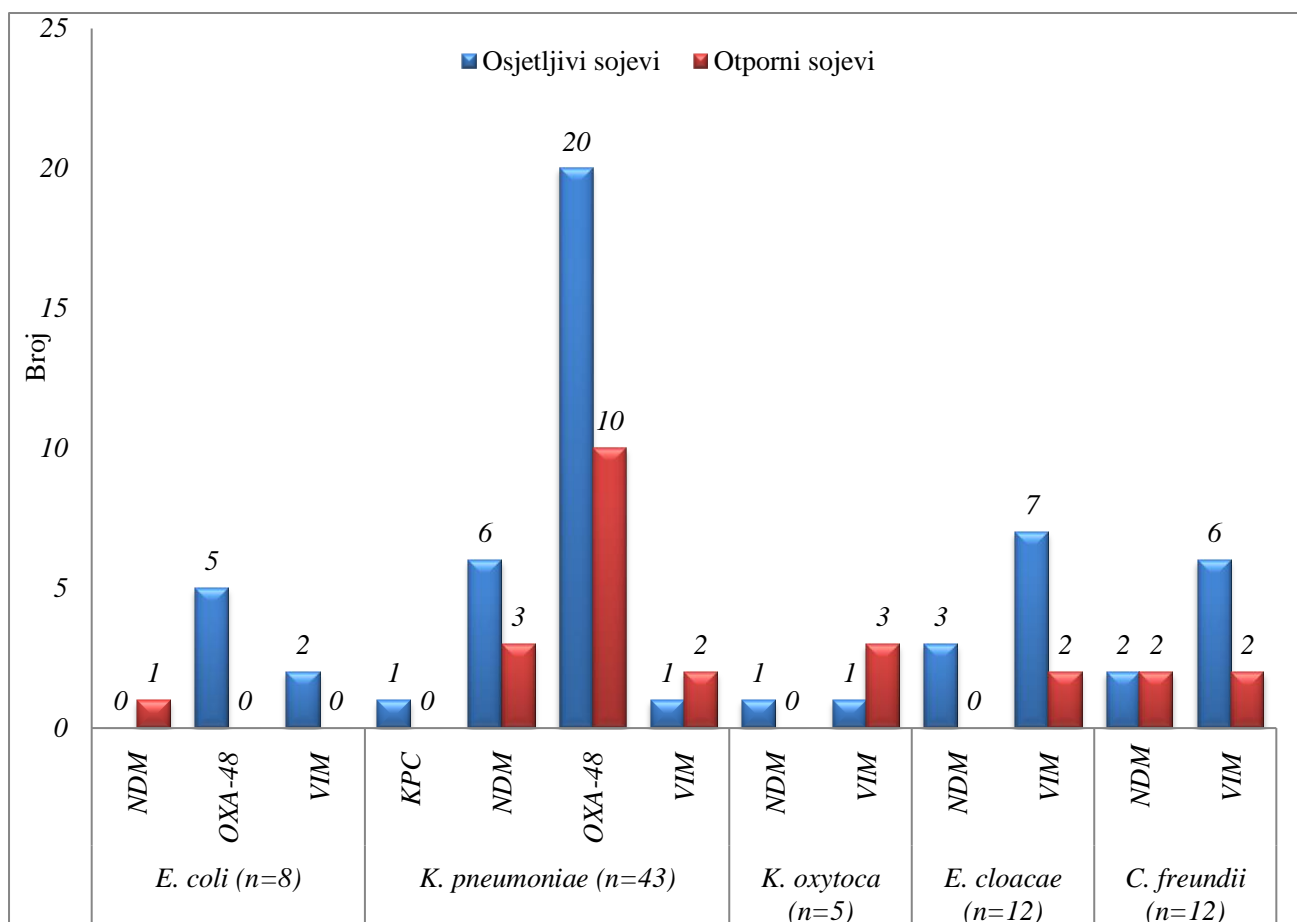
Na slici 9 je prikazan i postotak ukupnih osjetljivih i otpornih sojeva s obzirom na vrstu karbapenemaze gdje rezultat za KPC, koji pokazuje 100 %-tno osjetljivost, nije relevantan jer se radi o samo jednom soju *K. pneumoniae*. Za sojeve koji stvaraju OXA-48 se može reći da su najosjetljiviji na eravaciklin s ukupno 71,4 % (25/35) osjetljivih sojeva, nakon toga slijedi VIM sa 65,4 % (17/26) osjetljivih sojeva te potom metalo-beta-laktamaza NDM s ukupno 61,1 % (11/18) osjetljivih sojeva. Statistička analiza pomoću Fisher-ovog egzaktnog testa je pokazala da je vrijednost  $P > 0,05$  što znači da ovakva klasifikacija na slici 9 nije statistički značajna. Vrijednosti MIK-a eravaciklina varirale su ovisno o vrsti karbapenemaze, posebno za *K. pneumoniae*. Naime, rezultat za OXA-48 tip karbapenemaze je veoma bitan jer su upravo sojevi koji stvaraju OXA-48 vrlo česti u Hrvatskoj i jedni od glavnih uzročnika kompliciranih infekcija.





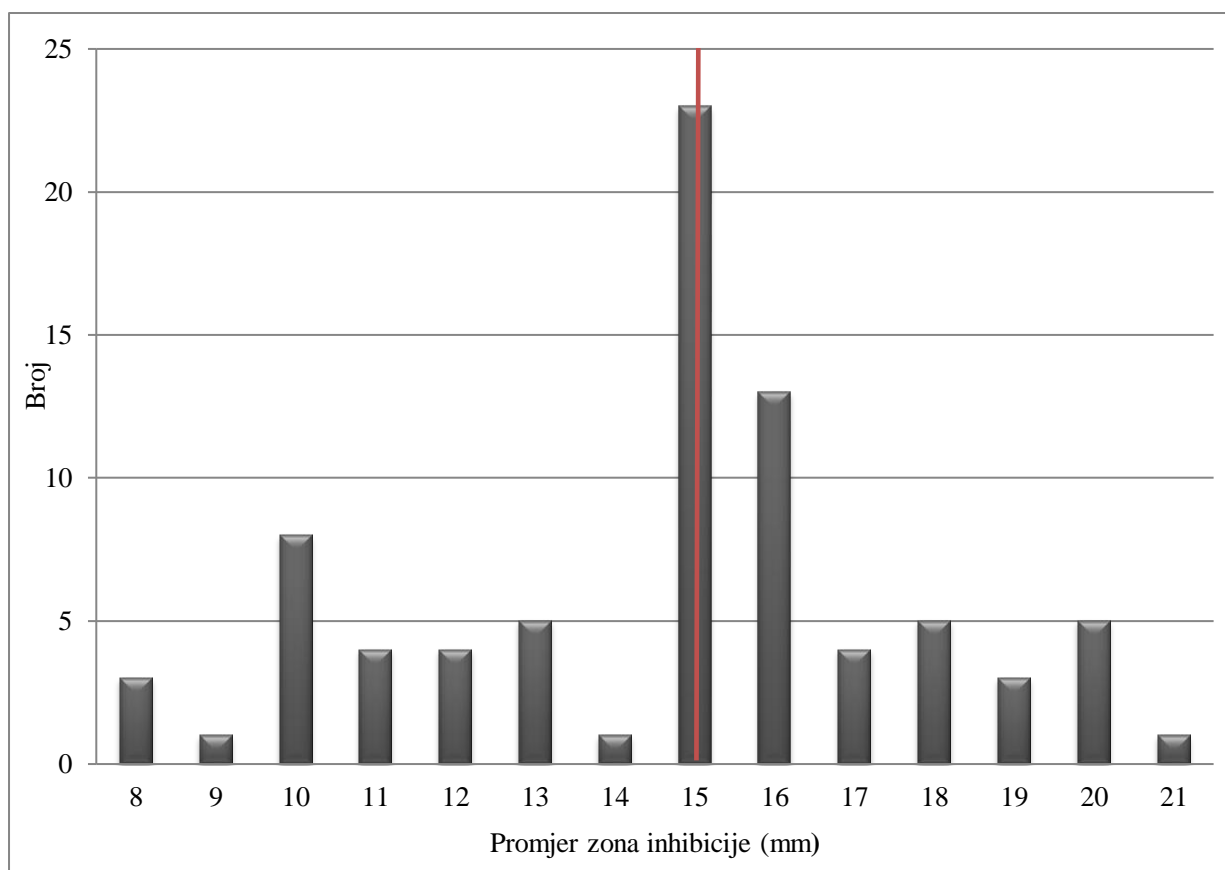
**Slika 9.** Prikaz postotka osjetljivih i otpornih CRE na eravaciklin s obzirom na vrstu karbapenemaze gdje n označava broja ukupnih karbapenemaza za pojedinu vrstu.

Slika 10 prikazuje broj CRE osjetljivih i otpornih na eravaciklin prema bakterijskoj vrsti i tipu karbapenemaze. Za soj *E. coli* koji je NDM pozitivan izolat, može se uočiti da je otporan na eravaciklin, dok je na ostale sojeve koji produciraju OXA-48 i VIM eravaciklin 100 % djelotvoran (sojevi su osjetljivi). Izolati *K. pneumoniae* koji stvaraju NDM i OXA-48 pokazuju osjetljivost od 50 %, dok je za VIM više otpornih sojeva, ali je uzorak mali. *K. oxytoca* pokazuje generalno najveću otpornost sa 75 % (3/5) VIM sojeva koji su otporni. Sojevi *E. cloacae* koji proizvode NDM i VIM pokazuju odlične rezultate sa 100 %-tnom osjetljivošću za NDM i 78 %-tnom (7/9) osjetljivošću za VIM. Djelotvornost eravaciklina na *C. freundii* pokazuje dobru osjetljivost za VIM sojeve i podjednak broj osjetljivih i otpornih sojeva kada je u pitanju NDM.



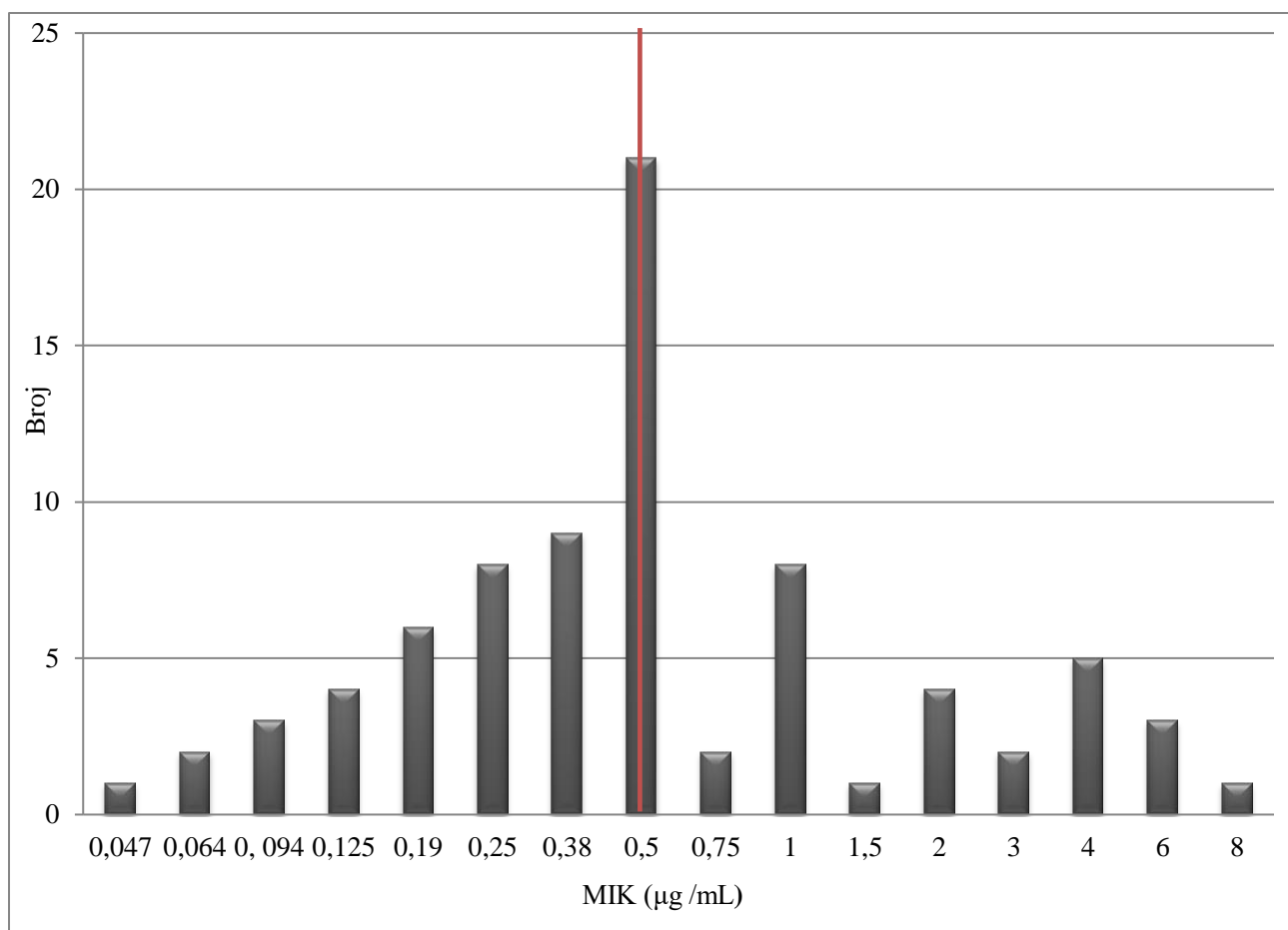
**Slika 10.** Prikaz broja CRE osjetljivih i otpornih na eravaciklin prema bakterijskoj vrsti i tipu karbapenemaze.

Prilikom obrade rezultata promatrana je distribucija zona inhibicije i vrijednosti MIK-a eravaciklina. Slika 11 prikazuje raspodjelu zona inhibicije gdje 3 izolata spadaju u skupinu od 8 mm promjera zone inhibicije, jedan izolat u skupini s izmjerenim promjerom 9 mm, 8 je izolata sa zonom inhibicije od 10 mm, njih 4 je s promjerom od 11 mm, 4 s promjerom od 12 mm, 5 ih je s promjerom od 13 mm i jedan izolat pokazuje zonu inhibicije od 14 mm. Zone inhibicije analiziranih izolata kretale su se u rasponu od 8 do 21 mm, a najveći broj sojeva pripada skupini sa zonom inhibicije od 15 mm (23 izolata) i 16 mm (13 izolata). Takvi sojevi su slabije osjetljivi za razliku od 4 soja s promjerom 17 mm, 5 sojeva sa zonom inhibicije od 18 mm, 3 izolata s promjerom 19 mm te 5 izolata koji pokazuju zonu inhibicije od 20 mm, odnosno jednim najosjetljivijim izolatom s promjerom 21 mm.



**Slika 11.** Distribucija sojeva prema veličini zone inhibicije (mm) eravaciklina. Crvena linija na 15 mm označava granicu osjetljivosti za eravaciklin.

Graf na slici 12 prikazuje raspon vrijednosti MIK od 0 do 8  $\mu\text{g/mL}$  gdje se sojevi s vrijednostima 0,5  $\mu\text{g/mL}$  smatraju osjetljivima na eravaciklin. Prema vrijednostima MIK-a, ukupno su 54 soja osjetljivi, od kojih 10 sojeva ima  $\text{MIK} \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$  ( $n(0,047 \mu\text{g/mL})=1$ ;  $n(0,064 \mu\text{g/mL})=2$ ;  $n(0,094 \mu\text{g/mL})=3$ ;  $n(0,125 \mu\text{g/mL})=4$ ), 6 ih ima MIK 0,19  $\mu\text{g/mL}$ , 8 sojeva 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , 9 sojeva 0,38  $\mu\text{g/mL}$ , a čak 21 soj 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , što je gornja granica za kategoriju osjetljivosti. MIK-ovi otpornih bakterijskih sojeva kretali su se u rasponu od 0,75 do 8  $\mu\text{g/mL}$ . Skupina od 2 izolata, kod kojih je vrijednost MIK eravaciklina 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , i 8 izolata, kod kojih je 1  $\mu\text{g/mL}$ , jesu nešto slabije otporni za razliku od sojeva s većom minimalnom inhibitornom koncentracijom. Tako jedan CRE izolat spada u skupinu gdje je MIK 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , 4 imaju MIK od 2  $\mu\text{g/mL}$ , 2 soja imaju MIK od 3  $\mu\text{g/mL}$ , 5 izolata od 4  $\mu\text{g/mL}$  i 3 najotpornija soja imaju vrijednost MIK 6  $\mu\text{g/mL}$ , odnosno za samo jedan soj je zabilježena vrijednost od 8  $\mu\text{g/mL}$ .



**Slika 12.** Distribucija sojeva prema vrijednostima minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) eravaciklina. Crvena linija na 0,5 µg/mL označava granicu osjetljivosti za eravaciklin.

## 5. RASPRAVA

Eravaciklin nije beta-laktamski antibiotik te ima drugačiji mehanizam djelovanja od onog u karbapenema pa može izbjeći mehanizme rezistencije KRE i tako osigurati alternativnu terapiju te pokazati veću učinkovitost. Provedeno je istraživanje na ukupno 80 kliničkih izolata, a analiza se vršila metodama disk difuzije i određivanjem MIK-ova pomoću E-testa. Pokazalo se da je više od polovice ispitivanih sojeva CRE, odnosno 67,5 %, osjetljivo na eravaciklin. Ovakva antimikrobna djelotvornost eravaciklina u uvjetima *in vitro* pokazuje da je eravaciklin jedna od mogućih opcija za liječenje teških infekcija uzrokovanih s CRE . U sličnoj prethodnoj studiji na više od 4000 gram-negativnih patogena iz bolnice u New York-u, eravaciklin je pokazao odličnu djelotvornost u uvjetima *in vitro* protiv enterobakterija kao što su *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* i *E. cloacae*, s niskim vrijednostima MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> (Lee i sur. 2019).

U ovom istraživanju najnižu vrijednost MIK-a za eravacilin pokazuju sojevi *E. coli*, kao što je to bio slučaj u nedavnom istraživanju kada se ispitala djelotvornost eravaciklina na multirezistentne gram-negativne bakterije. Tada su za sve ispitivane izolate *E. coli*, svi MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> rezultati bili unutar raspona osjetljivosti prema FDA kriterijima, uključujući i izolate otporne na karbapeneme. Za enterobakterije, kao cjelinu, MIK<sub>50</sub> obično je bio niži od granične vrijednosti prema FDA kriterijima od 0,5 µg/ml za CRE (Lan i sur. 2019). Osim sojeva *E. coli*, visoku osjetljivost na eravaciklin su u ovoj studiji pokazali i izolati *E. cloacae* kao što je to bio slučaj u nedavnoj studiji u Kini na 336 bolničkih izolata gdje je vrijednost MIC<sub>50</sub> eravaciklina za *E. cloacae* i *E. coli* bila znatno niža nego vrijednosti ostalih uspoređivanih lijekova, posebno u sojeva s rezistentnim fenotipovima (Zhao i sur. 2019).

Djelotvornost eravaciklina od 87,5 % za sojeve *E. coli* i 83,3 % za izolate *E. cloacae* mogu biti posljedica smanjene koncentracije karbapenemaza OXA-48 i VIM, odnosno samo VIM za *E. cloacae*, smanjene hidrolitičke aktivnosti karbapenemaza, intenzivnije permeabilnosti bakterijske membrane za eravaciklin ili pak pojačanog afiniteta vezanja eravaciklina za 30S podjedinicu ribosoma. Za *K. pneumoniae* se distribucija MIK vrijednosti eravaciklina razlikovala ovisno o tipu karbapenemaze (Zhao i sur. 2019), što je potvrdila i ova studija. Tako je djelotvornost eravaciklina na *K. pneumoniae* bila 65,1 %, a najučinkovitiji je bio protiv sojeva koji proizvode OXA-48 i NDM. Slične rezultate pokazali su izolati *C. freundii* s nešto nižom osjetljivošću (58,30 %) gdje sojevi s VIM pokazuju slabiju otpornost na eravaciklin, dok je broj osjetljivih i otpornih sojeva podjednak kada je u pitanju NDM. Za

sojeve s NDM se ovakvi rezultati i očekuju s obzirom na to da je deklariran kao jedan od najproblematičnijih beta-laktamaza jer zbog plazmida koji nose *bla<sub>NDM</sub>* gene mogu imati jako veliki broj determinanti rezistencije na antibiotike. Takvi geni se potom konjugacijom prenose na ostale sojeve bakterija što rezultira multirezistentnim fenotipom (Delpahande i sur. 2006).

Zabrinjavajuću otpornost na eravaciklin pokazuju sojevi *K. oxytoca*, što dosad nije zabilježeno u sličnim studijama eravaciklina. Od 80 % sojeva koji proizvode VIM, 75 % sojeva pokazuje otpornost na eravaciklin. Takvi rezultati su kontradiktorni s onima na slici 9 gdje je osjetljivost ukupnih CRE koje proizvode VIM prilično visoka. Ovakav rezultat se može pribilježiti pojačanom lučenju VIM karbapenemaza i *bla<sub>VIM-1</sub>* genu koji se nalazi na integronu, što pogoduje njegovom brzom širenju (Lauretti i sur. 1999). Broj izolata *K. oxytoca* koji su analizirani u ovom istraživanju je malen te bi se istraživanje svakako trebalo ponoviti na većem broju izolata ove bakterijske vrste.

Tigeciklin je strukturom i mehanizmom sličan eravaciklinu, a s obzirom na to da se u Kini koristi već dugi niz godina, pojavili su se i sojevi otporni na tigeciklin. Pokazalo se da je eravaciklin učinkovit u studijama u uvjetima *in vitro* protiv multirezistentnih patogena, s dvostruko većom aktivnosti od tigeciklina za CRE infekcije, sugerirajući da mehanizam koji dovodi do otpornosti na tigeciklin ne inhibira aktivnost eravaciklina. Zbog svoje odlične djelotvornosti naspram karbapenema ertapenema i meropenema, nakon IGNITE 1 i IGNITE 4 kliničke studije, 2018. godine je odobren za liječenje kompliciranih intraabdominalnih infekcija koje uzrokuju nozokomijalni patogeni poput enterobakterija. Nadalje, njegova visoka učinkovitost protiv CRE i CRAB-a mogla bi eravaciklin učiniti novim potencijalnim antibiotikom za liječenja kompliciranih infekcija, uključujući respiratorne infekcije i infekcije krvi (Sheu i sur. 2019, Zhao i sur. 2019).

Rezultati MALDI-TOF masene spektrometrije, PCR-a i agarozne gel elektroforeze su pokazali su da ispitivani CRE sojevi sadrže gene koji kodiraju za KPC, NDM, OXA-48 ili VIM karbapenemaze. Prva karbapenemaza iz enterobakterija izolirana je 1990. i od onda je njihov broj u konstantom porastu (Nordmann 2002).

Samo je jedan soj *K. pneumoniae* koji proizvodi KPC zabilježen u ovom ispitivanju, a pokazao se kao izrazito osjetljiv na eravaciklin. 2001. godine, Sjedinjene Američke Države izvijestile su o soju *K. pneumoniae* koji nosi gen za karbapenemazu posredovan na plazmidu i koji kodira protein, kasnije nazvan *K. pneumoniae* karbapenemaza (KPC) (Cui i sur. 2019).

Prvi enzim iz skupine KPC pojavio se u Hrvatskoj 2011. godine, a izoliran je iz soja *K. pneumoniae*. Izolat potječe od bolesnika koji je hospitaliziran u KBC Zagreb zbog operacije subduralnog krvarenja, a prije toga je bio na liječenju akutne mijeloične leukemije u drugoj bolnici u Hrvatskoj. Zahvaljujući učinkovitim mjerama kontrole bolničkih infekcija tj. kontaktnoj izolaciji nije došlo do pojave bolničke epidemije. Teško je objasniti podrijetlo soja jer bolesnik nije boravio, prije primitka u bolnicu, u zemljama u kojima su prethodno opisane KPC beta-laktamaze (Bedenić i sur. 2012). Nedavno su se pojavili međunarodni visokorizični bakterijski klonovi, kao što je *K. pneumoniae* ST258, koji proizvode upravo KPC. Ti su klonovi vrlo učinkoviti u kolonizaciji i vrlo su uspješni u prenošenju u bolničkim uvjetima (ECDC 2018).

Sojevi koji proizvode NDM karbapenemaze su treći po učestalosti u ovom ispitivanju te pokazuju veću otpornost na eravaciklin o odnosu na sojeve koji proizvode OXA-48 i VIM. U 2009. godini, u Indiji je prvi put prijavljena *K. pneumoniae* povezana s *bla<sub>NDM</sub>* otpornim na karbapenem i od tada je *bla<sub>NDM</sub>* otkriven u većini vrsta enterobakterija. Osim toga, *bla<sub>IMP</sub>* se proširio po cijelom Japanu otkako je IMP-1 prvi put otkriven u Okazakiju (Cui i sur. 2019). IMP karbapenemaze su u ovoj studiji, nakon OXA-48, najučestalije i pokazuju niske vrijednosti MIK-a za eravaciklin.

Beta-laktamaze klase D, nazvane su oksacilinaze (OXA). Godine 1985. pronađen je prvi gen koji kodira OXA u izolatu *A. baumannii* iz Ujedinjenog Kraljevstva i označen je kao *bla<sub>OXA-23</sub>*, a najčešća β-laktamaza klase D je OXA-48, koja je prvi put identificirana u izolatu *K. pneumoniae* iz Turske 2001 (Cui i sur. 2019). I u ovoj su studiji najzastupljenije karbapenemaze upravo OXA-48, a sojevi koji ih izlučuju pokazuju veoma dobru osjetljivost na eravaciklin.

Karbapenemaze u ovoj studiji pokazuju varijabilne hidrolitičke aktivnosti za eravaciklin. Sojevi koji stvaraju NDM imaju nešto snažniju hidrolitičku aktivnost prema eravaciklinu, dok sojevi koji proizvode OXA-48 imaju slabiju moć razgradnje eravaciklina pa samim time imaju niže MIK vrijednosti. Prethodne srodne studije karbapenema su pokazale da određena količina sojeva *K. pneumoniae* koji proizvode VIM i IMP, imaju niske MIK vrijednosti za karbapeneme, za ispitivane izolate. S druge strane, NDM karbapenemaze pokazuju više vrijednosti MIK-a za karbapeneme, dok izolati koji proizvode KPC pokazuju široki spektar varijacija MIK vrijednosti u različitim geografskim regijama. Kako bi se potakla štednja karbapenema, eravaciklin je u svakom slučaju moguća alternativna terapija iako je potrebno

više kliničkih podataka kako bi se podržala njegova upotrebu u liječenju ozbiljnih infekcija, ističući da uspješna terapija eravaciklinom za CRE infekcije svakako treba biti individualizirana, temeljena na ispitivanju osjetljivosti, težini bolesti i karakteristikama pacijenta (Chau i sur. 2019). Također bi se u budućim studijima trebala razmotriti i kombinirana terapija eravaciklina s drugim antibioticima s obzirom na njegovu slabu interakciju s drugim lijekovima.

Praktična vrijednosti ovog istraživanja je činjenica da se utvrdila potpuna podudarnost rezultata osjetljivosti dobivenih disk difuzijom i određivanjem MIK vrijednosti pomoću E-testa. Iz navedenog se može zaključiti da se obje metode mogu koristiti u ispitivanju osjetljivosti iako će većina laboratorija prednost, zbog povoljnije cijene, dati disk difuziji.



## 6. ZAKLJUČAK

- Metodom disk difuzije i E-testa eravaciklina utvrđeno je da je eravaciklin djelotvoran na 67,5 % kliničkih izolata enterobakterija otpornih na karbapeneme u uvjetima *in vitro*.
- Od ukupno pet vrsta ispitivanih bakterijskih vrsta, najveću osjetljivost na eravaciklin pokazuju sojevi *E. coli*, te potom *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. freundii* i *K. oxytoca*.
- Metodom PCR sa specifičnim početnicama utvrđena je prisutnost gena za četiri različite karbapenemaze u sljedećem broju:
  - ✓ Jedan KPC pozitivan izolat
  - ✓ 18 NDM pozitivnih izolata
  - ✓ 35 OXA-48 pozitivnih izolata
  - ✓ 26 VIM pozitivnih izolata
- Djelotvornost eravaciklina je različita s obzirom na tip karbapenemaze. Od četiri vrste karbapenemaza najveća djelotvornost eravaciklina se očituje kod sojeva koji proizvode OXA-48, a potom slijede sojevi koji stvaraju VIM i NDM. Utvrđena razlika nije bila statistički značajna.
- Od ukupno pet vrsta ispitivanih sojeva, najveću osjetljivost na eravaciklin s obzirom na tip karbapenemaze, pokazuju redom sojevi OXA-48 i VIM *E. coli*, NDM i VIM *E. cloacae*, NDM i OXA-48 *K. pneumoniae*, VIM *C. freundii* i NDM *K. oxytoca*.
- Disk difuzija i određivanje MIK vrijednosti metodom E-testa pokazale su potpunu podudarnost u ispitivanju osjetljivosti enterobakterija na eravaciklin.

## 7. LITERATURA

- Ambler P.R., Coulson A.F., Frere J.M., Ghuysen J.M., Joris B., Forsman M. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 276, 260-70.
- Bassetti M., Peghin M., Vena A., Giacobbe D.R. 2019. Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. *Frontiers in Medicine*, 6, 74-84.
- Bedenić B., Mazzariol A., Plečko V., Bošnjak Z., Barl P., Vraneš J., Cornaglia G. 2012. First report of KPC-producing *K. pneumoniae* in Croatia. *Journal Chemotherapy*, 24(4), 237-90.
- Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1211-33.
- Cui X. , Zhang H., Du H. 2019. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and antimicrobial therapy. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1823.
- Delpahande L.M., Jones R.N., Frische T.R. 2006. Occurrence and characterization of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2002-2004). *Microbial Drug Resistance*, 12, 223-30.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* - first update. ECDC, 2018.
- Franco-Paredes C. 2016. Chapter 2 - Bloodstream Infections. U: Franco-Paredes C. (ur.). *Core Concepts in Clinical Infectious Diseases (CCCID)*. Academic Press, 2016, 9-15.
- Gyllenberg H.G., M. Gyllenberg M., Koski T., Lund T., Schindler J., Verlaan M.. 1997. Classification of *Enterobacteriaceae* by minimization of stochastic complexity. *Microbiology*, 143, 721-32.
- Heaney M., Mahoney M. V., Gallagher J. C. 2019. Eravacycline: The tetracyclines strike back. *Annals of Pharmacotherapy*, 53(11), 1124-35.
- Jacoby G.A., Munoz-Price L.S. 2005. The new  $\beta$ -lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352, 380-91.
- Jaurin B., Grundstrom T. 1981. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 4897-901.

Jean S.S., Gould I.M., Lee W.S. 2019. New drugs for multidrug-resistant gram-negative organisms: time for stewardship. *Springer Link*, 79, 705-14.

Kalenić S., Bedenić B., Bošnjak Z. 2019. Enterobakterije. U: Kalenić S, ur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2019, str. 226.

Kalil A.C., Metersky M.L., Klompas M., Muscedere J., Sweeney D.A., Palmer L.B., Napolitano L.M., O'Grady N.P., Bartlett J.G., Carratalà J., El Solh A.A., Ewig S., Fey P.D., File T.M., Restrepo M.I., Roberts J.A., Waterer G.W., Cruse P., Knight S.L., Brozek J.L. 2016. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america and the american thoracic society. *Clinical Infectious Diseases*, 63(5), 61-111.

Kenneth S., Thomson K.S. 2010. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 1019-25.

Kuzman I., Schönwald S. 2000. *Infektologija*, Zagreb, 87-91,120-1.

Lan S.H., Chang S.P., Lai C.C., Lu L.C., Chao C.M. 2019. The efficacy and safety of eravacycline in the treatment of complicated intra - abdominal infections: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6), 866.

Lauretti L., Riccio M.L., Mazzariol A., Cornaglia G., AMIKosante G., Fontana R., Rossolini G.M. 1999. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo-  $\beta$ -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *AntiMicrobial Agents Chemotherapy*, 43(7), 1584-90.

Lee Y.R., Burton C.E. 2019. Eravacycline, a newly approved fluorocycline. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(10), 1787.

Livermore D.M. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 557-84.

Lopez N., Kobayashi L., Coimbra R. 2011. A Comprehensive review of abdominal infections. *World Journal of Emergency Surgery* 2011, 6,7.

Martinez J.L., Baquero F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 1771-7.

- Matthew M. 1979. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5, 349-58.
- Nordmann P., Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infections*, 8, 321-31.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791-7.
- Patterson C.M., Loebinger M.R. 2012. Community acquired pneumonia: assessment and treatment. *Clinical Medicine* 2012, 12(3), 283–6.
- Samaha-Kfoury J.N., Araj G.F. 2003. Recent developments in  $\beta$ -lactamases and extended spectrum  $\beta$  lactamases. *The British Medical Journal*, 327, 1209-13.
- Sabih A, Leslie S.W. 2019. Complicated urinary tract infections. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 13-13.
- Sheu C.C., Chang Y.T., Lin S.Y., Chen Y.H., Hsueh P.R. 2019. Infections caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae: an update on therapeutic options. *Frontiers in Microbiology*, 10, 80-93.
- Tambić-Andrašević A., Lucić S., Tambić T. 2018. Rezistencija na antibiotike u Hrvatskoj. *Medicina Fluminensis*, 54(3), 312-21.
- Tambić-Andrašević A., Tambić T, Katalinić-Janković V., Žmak L.J., Obrovac M., Payerl Pal M., Debelec D., Bukovski S., Hunjak B., Babić-Erceg A., Unukić T., Butić I., Šoprek S., Pristaš I, Lucić S. 2019. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Hrvatskoj. Zagreb: INTERGRAF-BI, 2019.
- Van Amersfoort E.S., Van Berkel J.C., Kuiper J. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology reviews*, 379-81.
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12): 6578–83.
- Woodford N., Ellington M.J., Coelho J. 2006. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 351-53.

World health organisation. 2014. Antimicrobial resistance global report on surveillance. Geneva: WHO, 2014.

Zhao C., Wang X., Zhang Y., Wang R., Wang Q. Li H., Wang H. 2019. *In vitro* activities of eravacycline against 336 isolates collected from 2012 to 2016 from 11 teaching hospitals in China. BMC Infectious Diseases, 508-19.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04.10.1995. godine u Zagrebu, ali sam odrasla u Kninu gdje sam nakon završetka osnovne škole upisala opću gimnaziju u srednjoj školi Lovre Montija. 2014. godine sam upisala Preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te sam 2017. godine stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije. Iste godine sam upisala Diplomski studij molekularne biologije jer sam razvila veliki interes za medicinsku genetiku, molekularnu dijagnostiku i genetičko inženjerstvo. Tijekom studija sam odradila laboratorijsku praksu u Laboratoriju za genetičko inženjerstvo i bila demonstrator u sklopu kolegija Mikrobiologija. Volontirala sam na znanstveno-popularizacijskom događaju Noć Biologije 2016. i 2017. godine te sam 2016. godine sudjelovala na simpoziju *Power of Microbes in Industry and Environment*. Član sam Udruge studenata biologije (BIUS) gdje sam bila dio Sekcije za mikrobiologiju i Sekcije za genetiku. Također sam 2017. i 2018. godine bila član Udruge eSTUDENT te djelovala u timu za popularizaciju znanosti u sklopu kojeg sam bila jedan od organizatora i voditeljica konferencije 'Mozak voli zdravo' te sam osim toga sudjelovala u organiziranju i provođenju raznih aktivnosti s edukativnim sadržajima, uključujući projekt 'Mozak voli zdravo', 'Znanost za sve' i 'Znanstveni piknik.' Također sam, uz studiranje, četiri godine radila studentski posao farmaceutskog prodajnog savjenika za nekoliko brendova u raznim ljekarnama u Zagrebu. Trenutno radim kao student u farmaceutskoj firmi za farmakovigilanciju lijekova (Primevigilance) kao PV associate.