

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Sara Sivec

**Beta-laktamaze proširenog spektra u urinarnim izolatima
Enterobakterija**

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Sivec

**Beta-laktamaze proširenog spektra u urinarnim izolatima
Enterobakterija**

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za Kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Bedenić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Branki Bedenić što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem na svim savjetima, pomoći i vremenu koje je utrošila pomažući mi oko izrade eksperimentalnog i teoretskog dijela rada.

Zahvaljujem svojem suvoditelju doc. dr. sc. Dubravku Pavokoviću na vremenu koje je uložio u reviziju mog rada te na svim njegovim savjetima.

Naposlijetku, želim se zahvaliti svojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i financiranju.

**BETA-LAKTAMAZE PROŠIRENOG SPEKTRA U URINARNIM IZOLATIMA
ENTEROBAKTERIJA**

Sara Sivec

Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Rooseveltove trg 6, 10 000 Zagreb

Mnogi sojevi enterobakterija uzročnici su infekcija kod čovjeka, najčešće mokraćnog i spolnog sustava, te su često uzročnici infekcija probavnog trakta, dok u zadnje vrijeme postaju sve značajniji uzročnik infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi.

Antibiotici su po definiciji farmakološki agensi koji mogu potpuno uništiti bakterije ili zaustaviti njihov rast ili razmnožavanje bez pričinjavanja značajnije štete organizmu domaćinu. U skupine koje djeluju na staničnu stijenu i membranu spadaju beta-laktamski antibiotici. To su: penicilini, cefalosporini i cefamicini, monobaktami, karbapenemi i inhibitori beta-laktamaza. Pojava rezistencije bakterija na antibiotike kompromitira uspjehe antibiotskih terapija i dostignuća medicine.

Beta-laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom razgrađuju amidnu vezu u beta-laktamskom prstenu penicilina, cefalosporina i monobaktama, stvarajući kiselinske derivate bez antibakterijske aktivnosti. Beta-laktamaze predstavljaju glavni mehanizam rezistencije bakterijskih patogena na beta-laktamske antibiotike. Beta-laktamaze proširenog spektra su plazmidno kodirani enzimi nastali točkastom mutacijom u *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} genu, te od kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterijske vrste *Klyvera ascorbata* horizontalnim prijenosom gena i posljedičnom mutacijom.

Ovo istraživanje rađeno je na 121 urinarnom izolatu sakupljenom u Kantonalnoj bolnici u Zenici, Bosna i Hercegovina. Poslani su uzorci na koje se sumnjalo na proizvodnju beta-laktamaza proširenog spektra pa se prevalencija ne poklapa s podacima iz dosadašnjih istraživanja jer se ona odnose na prevalenciju u ukupnoj istraživanoj populaciji. Naši rezultati su puno većih vrijednosti. Ti su uzorci testirani na osjetljivost na razne antibiotike, izrađeni su antibiogrami, te su rađeni testovi konjugacije s plazmidima.

(51 stranica, 5 slika, 14 tablica, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: enterobakterije, beta-laktamaze, beta-laktamaze proširenog spektra, rezistencija, antibiotik, beta-laktamski antibiotici, bolnica

Voditelj: Dr. sc. Branka Bedenić, izv. prof.
Suvoditelj: Dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.
Ocjenitelji: Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
Dr. sc. Martina Šeruga Musić, doc.

Rad prihvaćen: 12.03.2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE IN THE URINARY ISOLATES OF ENTEROBACTERIACEAE

Sara Sivec
Department of Biology, Faculty of Science
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Many strains of Enterobacteriaceae are causing infections in humans, mostly of the urinary and reproductive system, and often cause gastrointestinal infections, while lately have become important cause of infections associated with the health care.

Antibiotics are defined as pharmacological agents that can completely destroy the bacteria or stop their growth or reproduction without causing significant damage to the host organism. The group of antibiotics that act on the cell wall and membrane is beta-lactam antibiotics. These are: penicillins, cephalosporins and cephamicins, monobactams, carbapenems and beta-lactamase inhibitors. The emergence of bacterial resistance to antibiotics compromises the success of the antibiotic therapy and medical achievements.

Beta-lactamases are bacterial enzymes that degrade by hydrolysis of amide bond in the beta-lactam ring of penicillins, cephalosporins and monobactams, producing acidic derivatives without antibacterial activity. Beta-lactamases represents a major mechanism of resistance of bacterial pathogens in beta-lactam antibiotics. Extended spectrum beta-lactamases are plasmid encoded enzymes became by point-mutation in *bla*_{TEM} or *bla*_{SHV} gene, or from chromosomal AmpC beta-lactamase *Klyvera ascorbata* by horizontal gene transfer and mutation.

This study was obtained from 121 urinary isolates collected in the Cantonal Hospital in Zenica, Bosnia and Herzegovina. Sent samples were suspected of ESBL production and the prevalence does not coincide with the data from previous studies because these were related to the prevalence in the total population. Our results have much larger values. Samples were tested for sensitivity to various antibiotics, antibiograms were made, and conjugation tests were done with plasmids.

(51 pages, 5 figures, 14 table, 50 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: Enterobacteriaceae, beta-lactamases, extended spectrum beta-lactamase, bacterial resistance, antibiotic, beta-lactam antibiotics, hospital

Supervisor: Dr. Branka Bedenić, Assoc. Prof.
Cosupervisor: Dr. Dubravko Pavoković, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 12.03.2014.

Popis kratica

IMS	Infekcije mokraćnog sustava
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase (Beta-laktamaze proširenog spektra)
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
PBP	Penicillin-binding protein (Protein koji veže penicilin)
NAM	N-acetil-muraminska kiselina
NAG	N-acetil-glukozamin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamintetraoctena kiselina)
PCR	Polymerase chain reaction (Lančana reakcija polimerazom)
CFU	Colony-forming unit (jedinica koje tvore kolonije)
SDS	Sodium lauryl sulfate (Natrijev lauril-sulfat)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Enterobakterije.....	1
1.1.1 Infekcije mokraćnog i probavnog sustava.....	2
1.2. Antimikrobni lijekovi	3
1.1.2 Otkriće antibiotika i važnost u današnjoj medicini	5
1.1.3 Podjela antibiotika.....	6
1.1.4 Rezistencija na antibiotike.....	11
1.3. Beta-laktamaze	13
1.2.1 Klasifikacija beta-laktamaza	14
1.2.2 Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL).....	17
1.2.2.1 TEM beta-laktamaze	18
1.2.2.2 SHV beta-laktamaze	19
1.2.2.3 CTX-M beta-laktamaze.....	19
1.2.3 KARBAPENEMAZE	20
2. CILJ RADA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Sojevi.....	23
3.2. Testiranje osjetljivosti na antibiotike	24
3.2.1 Disk difuzijski test.....	24
3.2.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)	25
3.2.3 Detekcija ESBL - dvostrukim disk sinergističkim testom	26
3.2.4 Detekcija ESBL - CLSI konfirmatorni test	27
3.2.5 Detekcija produkcije kromosomske AmpC beta-laktamaze	27
3.3. Prijenos rezistencije konjugacijom	27
3.4. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	28
3.4.1 Pročišćavanje PCR produkta	29
4. REZULTATI	30
4.1. Prevalencija ESBL.....	30
4.2. Osjetljivost na antibiotike detektirana dilucijskom metodom	35
4.3. Detekcija AmpC beta-laktamaza metodom kombiniranih diskova	36
4.4. Prijenos rezistencije konjugacijom	37
4.5. Karakterizacija beta-laktamaza PCR-om.....	38
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČAK	44
7. LITERATURA	45
8. ŽIVOTOPIS	50

1. UVOD

1.1. Enterobakterije

Enterobakterije su velika porodica Gram-negativnih štapićastih bakterija u koje spada 20 rodova i oko 100 vrsta. Najčešće su pokretne i ne stvaraju spore. Fakultativni su anaerobi, metabolički su aktivne i čine oko 5 posto ukupne fiziološke flore probavnog trakta ljudi i životinja. U čovjeka se nalaze u sluznici crijeva, mokraćno-spolnog sustava, te u malom broju i u gornjem dišnom sustavu. Po patofiziološkom djelovanju mogu biti primarni patogeni, uvijetni patogeni ili oportunisti.

Po morfologiji, to su bakterije duljine 2-4 μm , širine 0,4-0,6 μm , kokobacilnih ili izduženih oblika sa zaobljenim krajevima. Uglavnom su pokretne, te često imaju peritrihijalne flagele ili fimbrije koje ne služe za pokretanje već za prihvaćanje na površinu stanica (Kalenić i Mlinarić-Misonni 1995).

Enterobakterije su metabolički vrlo aktivne. Kao fakultativni anaerobi mogu fermentirati ugljikohidrate ili koriste Krebsov ciklus. Sve koriste glukozu, reduciraju nitrata u nitrite i oksidaza-negativne su. Osjetljive su na temperature iznad 60 °C i na sve dezinficijense. Uništava ih pasterizacija mlijeka, kloriranje vode, te sušenje.

Stanična stijenka sastoji se od vanjske i unutarnje membrane. Vanjska membrana građena je od dva sloja. Gornji sloj se sastoji od lipopolisaharida koji čine dvije komponente: lipid i veza različitih šećera sa glikofosfatom. Lipopolisaharid izgrađuje temeljnu komponentu O-antigena (somatskog antigena), uz šećer i glikofosfat, a zajednički je za sve Gram-negativne bakterije. Enterobakterije sadrže još i H-antigen koji se sastoji proteina flagelina (koji gradi flagele) i specifični su za pojedine vrste bakterija, te K-antigen (kapsularni antigen) koji je izgrađen od polisaharida (Weisglass 1994).

Neke vrste porodice *Enterobacteriaceae* su patogene za čovjeka s normalnom funkcijom imunog sustava, dok su druge oportunistički patogeni. Primarno patogeni članovi su šigele koje uzrokuju bacilarnu dizenteriju, te salmonele, jersinije i određeni tipovi bakterija *Escherichia coli*. Ostali tipovi mogu biti ili jesu fiziološka flora čovjeka, te izazivaju bolest kada promijene stanište, ili u imunodeficijentnih bolesnika. Mogu izazvati različite oblike

infekcija (najčešće mokraćnog sustava), sepse, infekcije kirurških rana, bakterijemiju, infekcije pluća, meningitis i sl. (Kučišek-Tepeš 1994).

Enterobakterije su najpromjenjivija porodica bakterija s obzirom na osjetljivost na antimikrobna sredstva. Osjetljivost je ovisna o kromosomima ili plazmidima ili kombinaciji jednog i drugog. Uglavnom su osjetljive na peniciline širokog spektra, cefalosporine, aminoglikozide, kloramenikol, tetracikline, sulfonamide, te kinolone.

Za razliku od bakterija roda *Escherichia*, pripadnici roda *Klebsiella* su enterobakterije bez bičeva koje posjeduju jasno izraženu kapsulu. *Enterobacter* spp. je enterobakterija slična klebsijeli ali je pokretan jer ima peritrihijalne flagele. U čovjeka izaziva bolest samo kao oportunistička bakterija (u osoba sa oslabljenim imunitetom zbog prirodnih ili stečenih imunodeficijencija ili kod bolesnika koji su na terapiji kortikosteroidima ili citostaticima pa im je jatrogeno oslabljen imunitet). Bakterije roda *Citrobacter* su pokretne enterobakterije. Njihovo je stanište slobodna priroda i probavni trakt čovjeka. To su oportunističke bakterije koje mogu izazvati sistemske infekcije kod čovjeka kao što su pneumonija, sepsa, meningitis i infekcije rana i opekotina (Katzung i sur. 2011).

1.1.1 Infekcije mokraćnog i probavnog sustava

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) ubrajaju se u najčešće bakterijske infekcije odrasle dobi. Četrdeset do pedeset posto žena tijekom života barem jednom doživi infekciju mokraćnog sustava, dok je učestalost kod muškaraca znatno niža ali se povećava sa starijom životnom dobi. Kod osoba muškog spola u starijoj životnoj dobi se češće javljaju komplicirane infekcije urinarnog trakta zbog hipertrofije ili tumora prostate. Infekcijom može biti zahvaćen bilo koji dio mokraćnog sustava a često je teško odrediti mjesto infekcije. Najčešće su infekcije uzrokovane bakterijama koje su dio fiziološke crijevne mikroflore, i nastaju ascendentnim putem. Kod prvih akutnih IMS-a uzročnik je najčešće *E. coli*, a kod kompliciranih IMS-a su uglavnom uzročnici roda *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp i *Acinetobacter* spp. Gram-pozitivni uzročnici rjeđe uzrokuju IMS. Mikrobiološki kriterij za postojanje infekcije je nalaz značajne bakterijurije što znači nalaz >100 000 bakterija u 1 ml mokraće (čistog uzetog uzorka srednjeg mlaza mokraće), dok manji broj bakterija može biti značajan ako se radi o osobama s recidivirajućim infekcijama urinarnog trakta. Urin se obrađuje ako raste jedna vrsta

bakterija. Iznimno mogu dvije vrste bakterija uzrokovati infekciju ako se radi o dijabetičaru ili trudnici (Andrašević i Tambić-Andrašević 2006).

Osim infekcija mokraćnog sustava, enterobakterije su često uzročnici infekcija probavnog trakta te u zadnje vrijeme postaju sve značajniji uzročnik infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi.

Enterobakterije imaju sposobnost klonalnog širenja između bolesnika, pa iz tog razloga predstavljaju problem za kontrolu infekcija. To je poseban problem u jedinicama intenzivnog liječenja gdje se troše velike količine antibiotika koje vrše selekcijski pritisak i omogućuju preživljavanje mutantima koji su razvili rezistenciju. Postupci za kontrolu mikroorganizama uključuju: odabir odgovarajuće terapije za inficirane bolesnike, primjena mjera za kontrolu infekcije i primjena mjera za kontrolu upotrebe antibiotika.

Rizični faktori za kolonizaciju ili infekciju izolatima enterobakterija koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) su:

- dužina boravka u bolnici ili jedinici intenzivnog liječenja,
- nedavni kirurški zahvat,
- prethodna terapija antibioticima,
- instrumentalni zahvat (kateterizacija, intubacija, mehanička ventilacija),
- težina osnovne bolesti,
- prethodni boravak u staračkom domu (Damani 2004).

1.2. Antimikrobni lijekovi

Antibiotici su tvari koje proizvode mikroorganizmi (bakterije, gljive), koje u niskim koncentracijama sprječavaju ili inhibiraju rast drugih mikroorganizama. Antibiotici u širem smislu obuhvaćaju i derivate koji se u potpunosti ili djelomično proizvode kemijskim putem (sintezom). Do danas je više od 400 antibiotika izolirano iz mikrobnih izvora, dok je pripremljeno više od 30 000 sintetskih/polusintetskih antibiotika. U kliničkoj praksi koristi se oko 100 raznih antibiotika.

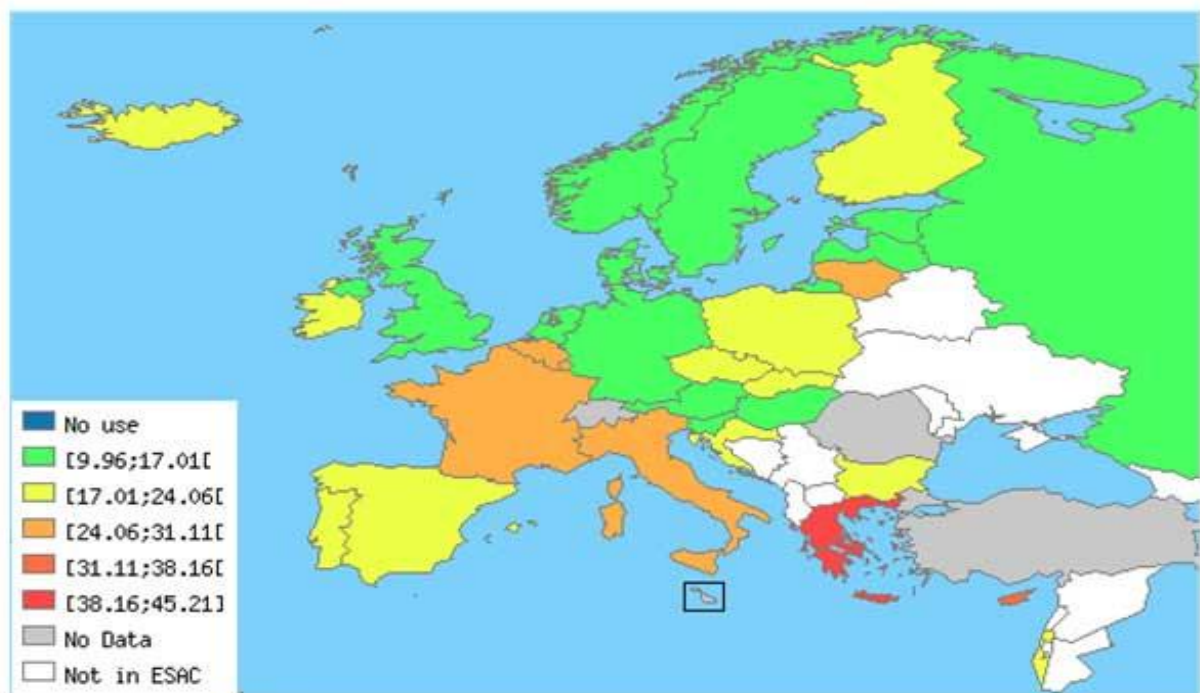
Mogu se klasificirati prema vrsti organizma na koji djeluju:

- Antibakterijski lijekovi

- Antivirusni lijekovi
- Antifungici
- Antiprotozoici
- Antihelmintici

Antibiotici su po definiciji farmakološki agensi koji mogu potpuno uništiti bakterije ili zaustaviti njihov rast ili razmnožavanje bez pricinjavanja značajnije štete organizmu domaćinu (Bulat i sur. 2004).

Korištenje antibiotika u ambulantnoj njezi, tj. izvan bolnice, izražena je u definiranim dnevnim dozama na 1000 stanovnika po danu (DDD) (Slika 1). Države južne i istočne Europe imaju najveću potrošnju (crveno), dok je potrošnja znatno niža na sjeveru Europe i u Ruskoj Federaciji (zeleno). U 2006. godini u Hrvatskoj je potrošeno 21,2 DDD antibiotika u izvanbolničkom i 1,63 DDD u bolničkom liječenju. Od 25 zemalja koji su podnjeli podatke o potrošnji antibiotika za 2006. godine Hrvatska zauzima 15. mjesto na ljestvici zemalja koje najmanje troše antibiotike. To ukazuje na potrebu javne kampanje kojom bi se javnosti skrenula pažnja na nužnost racionalizacije uporabe antibiotika.



Slika 1. Potrošnja antibiotika u Europi (2006)

(preuzeto sa: http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50220)

1.1.2 Otkriće antibiotika i važnost u današnjoj medicini

Lijekovi se koriste za liječenje infektivnih bolesti od 17. stoljeća (kinin za liječenje malarije, emetin za amebijazu), ali kemoterapija kao znanost počinje u prvom desetljeću 20. stoljeća s razumijevanjem principa selektivne toksičnosti, specifične kemijske veze između mikrobnog patogena i lijeka, razvoja bakterijske rezistencije na antibiotike i uloge kombinirane terapije. Pokusi su doveli do upotrebe arsena za liječenje luesa što je bio prvi planirani kemoterapijski postupak. Diferencijalno bojenje tkiva i bakterija je bilo temelj istraživanja kemoterapije jer se pokazalo da se kemijski spojevi drukčije odnose prema domaćinu nego prema parazitu, što se pokazalo kao osnova selektivne toksičnosti. Paul Ehrlich je 1906. godine utvrdio da treba pronaći tvari koje imaju veću moć uništavanja parazita bez veće štete za stanice domaćina tako da se omogući razaranje parazita bez nuspojava za makroorganizam. Selektivna toksičnost je uvijek relativna a ne apsolutna jer svaki antibiotik ima neke nuspojave (Rang i sur. 2006).

Otkriće antibiotika i njihova klinička primjena je jedan od najvažnijih dostignuća u medicini dvadesetog stoljeća. Otkriće antibiotika 20-ih godina prošlog stoljeća mnogo je doprinijelo ukupnom zdravlju ljudi. Svjetska zdravstvena organizacija navodi podatak da su antibiotici produžili životni vijek ljudi za 10 godina (Kučišek-Tepeš 1994).

„Kad sam se probudio netom nakon zore 28. rujna 1928. godine, zasigurno nisam planirao iz korijena promijeniti svu medicinu otkrivanjem prvog antibiotika na svijetu, tj. ubojice bakterija ... Ali upravo sam to učinio.“ Citirani tekst izrekao je Alexander Fleming, dobitnik Nobelove nagrade za otkriće penicilina, prvog antibiotika, učinkovitog lijeka za liječenje bakterijskih bolesti. Penicilin je otkriven 1929. godine kada je Fleming primjetio da je plijesan koja je kontaminirala kulturu stafilokoka razorila okolne kolonije bakterija. Taj filtrat bujonske kulture plijesni je nazvao penicilin i utvrdio je da on ima antibakterijski učinak. Chain i Florey su 1939. pročistili penicilin i utvrdili njegovu djelotvornost i izrazito malu toksičnost u eksperimentalnim infekcijama. 1940. prvi je put korišten kao terapijski agens kod bolesnika koji je imao multiple apscese na koži i u plućima. Primjena penicilina je dovela do poboljšanja, pada temperature i povlačenja apscesa. Prije primjene na bolesniku penicilin je testiran na osobi oboljeloj od karcinoma dojke u terminalnom stadiju i utvrđeno je da nema značajnih nuspojava osim laganog povišenja temperature (Numanović 2011).

Za izražavanje djelotvornosti antibiotika koristi se pojam minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), odnosno najniže koncentracije antibiotika koja će spriječiti rast mikroorganizama. Obično se izražava u $\mu\text{g/ml}$ ili mg/L . MIK vrijednost klinički je važna za određivanje osjetljivosti uzročnika na određeni antibiotik, određivanje doze antibiotika, te praćenje djelotvornosti terapije, odnosno rezistencije na antibiotik tijekom terapije. Što je MIK vrijednost za neki antibiotik niža, to je antibiotik djelotvorniji, odnosno uzročnik je osjetljiviji (Šalković-Petrišić i Bradamante 2010, Livermore 1995).

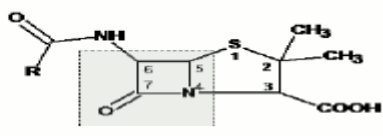
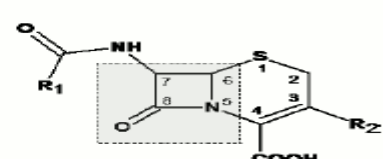
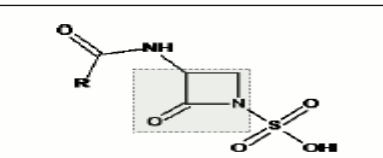
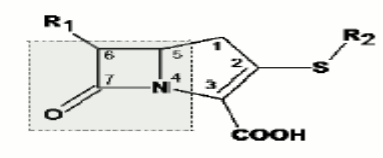
1.1.3 Podjela antibiotika

Antibiotici se dijele prema spektru djelovanja, učinku, kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja. Prema spektru djelovanja dijele se na antibiotike uskog ili širokog spektra djelovanja. Prema učinku ovisno o tome djeluju li zaustavljajući razmnožavanje bakterija (bakteriostatski) ili ubijajući bakterije (baktericidni) (Laurence i Bennett 1988).

Postoji 5 kategorija ovisno o mehanizmu djelovanja antibiotika:

- Inhibicija sinteze staničnog zida – Stanična stijenka daje bakteriji karakterističan oblik i štiti je od znatno nižeg osmotskog tlaka u okolini. Za integritet stijenke važna je njezina peptidoglikanska komponenta: sastoji se od N-acetil-glukozamina i N-acetil-muraminske kiseline na koje su poprečno vezane molekule pentapeptida (sloj peptidoglikana u Gram-pozitivnim bakterijama je znatno deblji nego u Gram-negativnim). Sinteza stijenke odvija se u nekoliko stupnjeva pa se pojedinim antibioticima može zaustaviti na različitim razinama. Beta-laktamski antibiotici ometaju završnu fazu sinteze peptidoglikana vezanjem na protein koji veže peniciline (PBP - Penicillin-binding proteins) molekule i inhibicijom transpeptidaza sprječavaju završno umrežavanje peptidoglikana (Medeiros 1997).
- Ometanje funkcije citoplazmatske membrane – Citoplazmatska membrana svih živih stanica selektivno je propusna. U svojoj strukturi sadrži lipide i proteine. Bakterijski lipidi su u prvom redu fosfolipidi. Neki antibiotici specifično poremećuju propustnost stanične membrane, čega je posljedica gubitak makromolekula i iona, te oštećenje stanice ili njena smrt (Bedenić 2009).

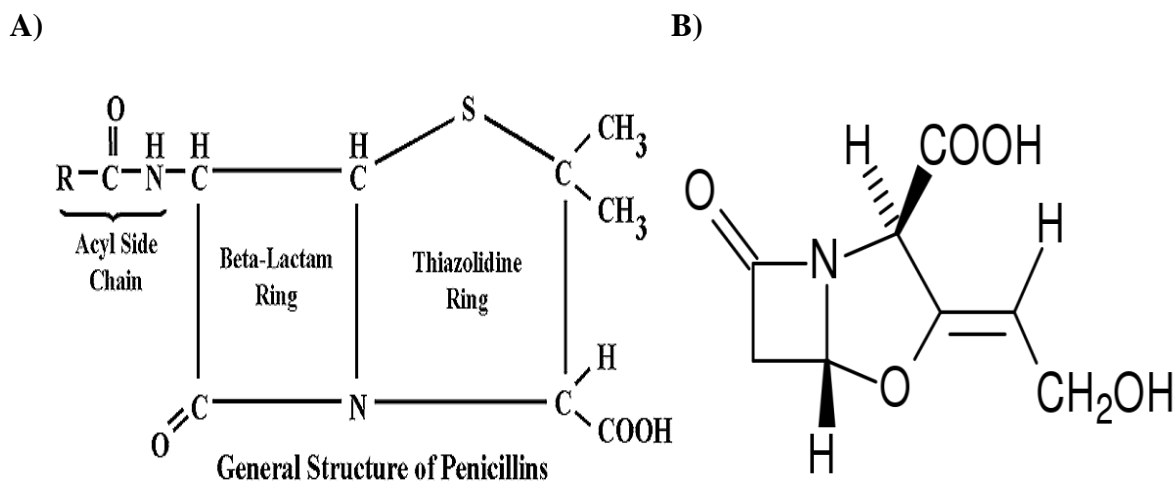
U ove dvije skupine spadaju beta-laktamski antibiotici koji djeluju na staničnu stijenku i membranu. To su: penicilini, cefalosporini i cefamicini, monobaktami, karbapenemi i inhibitori beta-laktamaza. Svi navedeni antibiotici nazvani su tako zbog jedinstvenog četveročlanog laktamskog prstena (Slika 2).

Group	Structure
Penicillins	
Cephalosporins	
Monobactams	
Carbapenems	

Slika 2. Kemijske strukture osnovnih tipova antibiotika

(preuzeto sa: <http://ra.webaddressdirectory.org/functional-groups-penicillin.html>)

Svi penicilini imaju temeljnu strukturu koja se sastoji od tiazolidinskog prstena pričvršćenog na beta-laktamski prsten koji nosi sekundarnu amino-grupu (RNH-) (Slika 3A). Zamjena R-ostataka u amino grupi omogućuje vezanje različitih postraničnih lanaca. Strukturna cjelovitost jezgre 6-aminopenicilanske kiseline važna je za biološku aktivnost. Hidrolizom beta-laktamskog prstena bakterijskim beta-laktamazama nastaje peniciloična kiselina koja nema antibakterijsku aktivnost.



Slika 3. A Opća struktura penicilina, B Struktura klavulanske kiseline
 (preuzeto sa: <http://www.studyblue.com/notes/note/n/penicillin-/deck/885410> i sa:
<http://insilicogenomics.in/clavulanic-acid.asp>)

Kemijska svojstva dijele peniciline ovisno o supstancijama na jezgri 6-aminopenicilanske kiseline u jednu od 3 skupine: penicilini (npr. penicilin G) – djeluju protiv Gram-pozitivnih organizama, Gram-negativnih koka i anaeroba koji ne stvaraju beta-laktamaze, antistafilokokni penicilini (npr. nafcilin, meticilin, kloksacilin) – djelotvorni su protiv stafilokoka i streptokoka, jer su otporni na stafilokoknu beta-laktamazu i penicilini proširenog spektra (aminopenicilini i antipseudomonasni penicilini) – imaju pojačanu aktivnost protiv Gram-negativnih organizama, naročito enterobakterija i ne-fermentativnih bakterija, iako je u novije vrijeme vrlo visoka stopa rezistencije na te peniciline (Bush 2011).

Cefalosporini su slični penicilinima, ali su otporniji na bakterijske beta-laktamaze te zbog toga imaju širi spektar djelovanja. Jezgru cefalosporina čini 7-aminocefalosporanska kiselina koja je slična 6-aminopenicilanskoj kiselini. Intrinzična antimikrobna aktivnost cefalosporina je mala, ali se dodavanjem različitih R₁ i R₂ grupa dobivaju stotine potentnih spojeva niske toksičnosti.

Cefalosporini se dijele u 4 generacije uglavnom ovisno o vremenu pojavljivanja. Cefalosporini 1. generacije (npr. cefazolin, cefadroksil) su djelotvorni protiv Gram-pozitivnih koka, cefalosporini 2. generacije (npr. cefaklor, cefonicid, cefmetazol) su djelotvorni protiv organizama na koje djeluju i cefalosporini 1. generacije ali uključuju još i neke Gram-negativne organizme. Cefalosporini 3. generacije (npr. cefotaksim, ceftazidim, ceftiakson) imaju prošireni Gram-negativni spektar, ali nisu potpuno djelotvorni protiv enterobakterija.

Imaju slab učinak na Gram-pozitivne koke. Od 1982. počinju se pojavljivati beta-laktamaze proširenog spektra koje mogu hidrolizirati i te novije cefalosporine a uglavnom ih proizvode hospitalni izolati *K. pneumoniae* i *E. coli* iako su opisane i u ostalih enterobakterija i čak u nefermentativnih bakterija. Cefalosporini 4. generacije (npr. cefepim) su mnogo rezistentniji na hidrolizu kromosomskim beta-laktamazama, ali još uvijek djelomično osjetljivi na hidrolizu beta-laktamazama proširenog spektra (Medeiros 1997).

Monobaktami su spojevi s monocikličkim beta-laktamskim prstenom. Djeluju protiv aerobnih Gram-negativnih štapićastih bakterija. Strukturno su slični cefalosporinima treće generacije. Otporni su na većinu beta-laktamaza sa iznimkom AmpC beta-laktamaza i beta-laktamaza proširenog spektra. U ovu skupinu spada aztreonam, jedini monobaktam u kliničkoj primjeni (Bedenić 2009).

Inhibitori beta-laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam) su slični beta-laktamskim spojevima ali imaju vrlo slabu antibakterijsku djelotvornost (Slika 3B). Potentni su inhibitori mnogih, ali ne svih bakterijskih beta-laktamaza i na taj način mogu peniciline podložne hidrolizi zaštititi od inaktivacije. Inhibiraju plazmidne beta-laktamaze uključujući i beta-laktamaze proširenog spektra. Kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterija iz rodova *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas* nisu osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom i ostalim inhibitorima iz te skupine koji mogu čak uzrokovati antagonistički efekt jer induciraju produkciju tih beta-laktamaza (Bedenić 2009).

Karbapenemi su strukturno slični beta-laktamskim antibioticima i u njih spadaju doripenem, ertapenem, imipenem i meropenem. Imaju širok spektar djelovanja prema Gram-negativnim, Gram-pozitivnim organizmima i anaerobima (Morin i Gorman 1982, Laurence i Bennett 1988).

Mehanizam djelovanja

Svi beta-laktamski antibiotici imaju sličan mehanizam djelovanja. Oni inhibiraju rast bakterija ometajući reakciju transpeptidacije tijekom sinteze stanične stijenke.

Stanična stijenka je kruti vanjski sloj, jedinstven bakterijskim stanicama. On u potpunosti obavija citoplazmatsku membranu održavajući oblik i cjelovitost stanice i sprečavajući staničnu razgradnju pod utjecajem visokog osmotskog tlaka. Stanična stijenka se sastoji od

peptidoglikana, kompleksa isprepletenih polimera polisaharida i peptida koji završava D-Alanin-D-Alanin aminokiselinskim ostacima. Polisaharid naizmjenično sadržava šećere, N-acetilglukozamin i N-acetilmuraminsku kiselinu. Nastajanje i ugradnja pojedinih dijelova peptidoglikana odvija se kroz 3 faze i velik broj enzimatskih reakcija, a beta-laktamski antibiotici djeluju na samom kraju toga niza. Tijekom procesa postraničnog vezanja sa susjednim peptidom protein koji veže peniciline (PBP) uklanja završni alanin iz peptida. Ovo isprepletanje omogućuje čvrstoću stanične stijenke. Kao strukturni analozi prirodnog D-Ala-D-Ala supstrata, beta-laktamski antibiotici se kovalentni vežu za aktivno mjesto PBP. Ovim vezanjem onemogućuje se reakcija transpeptidacije i zaustavlja sinteza peptidoglikana, zbog čega bakterijska stanica propada. Beta-laktamski antibiotici ubijaju bakterijske stanice samo u fazi njihova aktivnog rasta i sinteze stanične stijenke (Medeiros 1997).

- Inhibicija sinteze proteina – Sintaza proteina odigrava se na ribosomima bakterijskih stanica. Funkcionalna jedinica sinteze bakterijskih proteina je 70S, koja se sastoji od podjedinica 30S i 50S. Mnogi antibiotici koče sintezu proteina interferirajući s translacijom genetičke informacije kodirane u mRNA. Oni se vežu na ribosome i sprečavaju stvaranje peptidnih lanaca inhibicijom stvaranja peptidne veze, translokacije ili kretanja ribosoma uzduž mRNA. Struktura ribosoma kod čovjeka je različita od bakterijskih i na toj se razlici osniva selektivna toksičnost lijekova za bakterije.

Tetraciklini, makrolidi, klindamicin, kloramfenikol, steptogramini i oksalozolidinoni – Inhibiraju sintezu bakterijskih proteina vezanjem na ribosome i interferirajući s njima.

Aminoglikozidi (streptomycin, neomicin, kanamicin, gentamicin, amikacin, tobramicin, sisomicin, netilmicin) i spektinomycin – Ireverzibilni inhibitori sinteze proteina koji interferiraju s funkcijom ribosoma. Početni događaj je pasivna difuzija kroz pore na membrani i ulazak u stanicu, a taj prijenos može poboljšati npr. penicilin ili neki drugi antibiotik koji djeluje na staničnu stijenku. Unutar stanice aminoglikozidi se vežu na specifičnu 30S podjedinicu ribosoma i inhibiraju sintezu proteina na jedan od sljedećih načina: 1) upletanjem u inicijacijski kompleks stvaranja peptida, 2) krivim očitanjem mRNA koje dovodi do ugradnje krivih aminokiselina u peptide, ili 3) raspadanjem polisoma na neučinkovite monosome.

- Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina – U sintezi nukleinskih kiselina preko purina, folna kiselina i tetrahidrofolna kiselina esencijalni su međuprodukti. Mikroorganizmi za razliku od sisavaca ne mogu se koristiti već gotovom folnom kiselinom nego je moraju

sintetizirati unutar bakterijske stanice iz para-aminobenzojeve kiseline. Razni antibiotici mogu biti analozi spojeva u sintezi nukleinskih kiselina ili se vežu na enzime koji upravljaju replikacijom nukleinskih kiselina.

U ovu skupinu antibiotika spadaju sulfonamidi, trimetoprim i kinoloni. Sulfonamidi su strukturno slični para-aminobenzojevoj kiselini pa na principu kompetitivne inhibicije sprječavaju sintezu folne kiseline a bakterije lišene tog neophodnog metabolita se prestaju dijeliti. Trimetoprim koči slijedeću fazu a to je pretvaranje folne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu (foliničnu) i djeluju sinergistički sa sulfonamidima. Kombinacija sulfametoksazola i trimetoprima se naziva kotromoksazol i ima baktericidno djelovanje.

- Inhibicija metabolizma - Metabolizam je jedan od najvažnijih procesa svih organizama uz pomoć kojega stanice dolaze do energije za razne druge procese. Ako se dogodi degradacija enzima koji sudjeluju u metabolizmu stanice postaju nesposobne za normalno funkcioniranje (Bedenić 2009).

1.1.4 Rezistencija na antibiotike

Otkriće antibiotika i njihovo uvođenje u kliničku praksu nije samo bitno promijenilo terapiju zaraznih bolesti nego je i omogućilo razvoj kirurških zahvata i imunosupresivnih terapija. Nakon početnog ushićenja nakon otkrića antibiotika i pomisli da će zahvaljujući primjeni antibiotika bakterijske infekcije biti svladane, došlo je do preokreta jer se ustanovilo da bakterijski svijet pokazuje fascinantnu prilagodljivost i sposobnost da razvije rezistenciju na sve antimikrobne lijekove koji su do sad otkriveni. Pojava rezistencije bakterija na antibiotike pak kompromitira uspjehe antibiotskih terapija i dostignuća medicine. Od pronalaska prve rezistente bakterije na jedan antibiotik, pa pojave muktirezistentnih bakterija, do danas, čovjek stvara nove i nove antibiotike a mehanizmi rezistencije bakterija postaju sve složeniji. U zadnje vrijeme se ne pojavljuju novi antibiotici nego se ponovno uključuju u terapiju stari kao što je kolistin ako su jedini učinkoviti prema multirezistentnim sojevima (Andrašević i sur. 2006).

Prvi dokumentirani primjer rezistencije zabilježen je kod *Streptococcus pneumoniae* na etilhidrokuprein. U tridesetim godinama prošlog stoljeća opisana je rezistencija na sulfonamide u gonokoka a kasnije i u stafilokoka. Abraham i Chain su 1939. godine i prije prve upotrebe penicilina kod *Staphylococcus aureus* opisali enzime beta-laktamaze. Kasnije je dokazano da

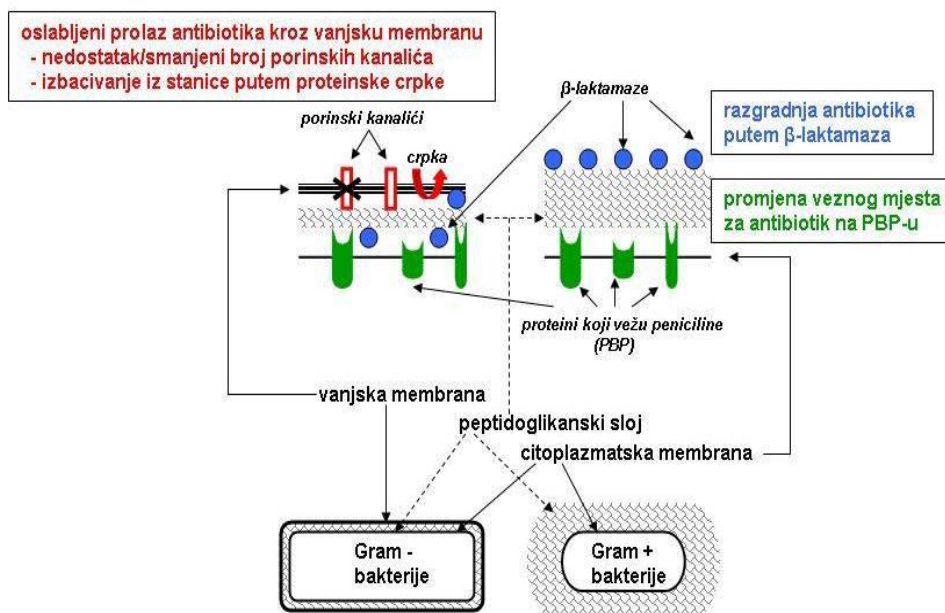
su ti enzimi odgovorni za brzi razvoj rezistencije patogena na beta-laktamske antibiotike diljem svijeta. Većina klinički primjenjenih antibiotika su prirodni produkti pa ne čudi da su geni koji kodiraju za rezistenciju isto nađeni u prirodi. Danas preko 90% stafilokoka proizvodi beta-laktamazu i otporni su na penicilin G, ali zadržavaju osjetljivost na izoksazolil peniciline, ako se ne radi o MRSA sojevima (meticilin rezistentni *S. aureus*) u kojih je došlo do modifikacije PBP2a - molekule koja predstavlja receptor za penicilin, tako da su takvi sojevi otporni na sve beta-laktamske antibiotike. Često uzrokuju epidemije hospitalnih infekcija (Sušić 2004).

Bakterije mogu biti rezistentne na neke antibiotike urođeno ili stečeno. Postoje tri vrste stečene rezistencije: mutacije u bakterijskom kromosomu, izmjena genetičkog materijala između bakterija i selekcija rezistentnih sojeva zbog velike prisutnosti antibiotika u okolišu. Do spontanih mutacija u genomu dolazi rijetko, a čimbenici o kojima ovisi da li će doći do mutacije su hipervarijabilnost regije, defekti u reparacijskom sistemu, izloženost stresu i dr. Horizontalan prijenos gena između bakterija može se dogoditi na tri načina: konjugacijom (direktnom izmjenom genetičkog materijala između bakterija), transdukcijom (ubacivanje strane DNA pomoću virusa) ili transformacijom (ubacivanje DNA endocitozom iz okoliša) (Hawkey 2008, Bedenić 2009).

Postoje četiri mehanizma rezistencija na peniciline i ostale beta-laktame: 1) inaktivacija antibiotika beta-laktamazama, 2) modifikacija ciljnog PBP-a, 3) smanjeni prodor antibiotika do ciljnog PBP-a, te 4) izbacivanje antibiotika iz stanice. Najčešći mehanizam rezistencije je stvaranje beta-laktamaza (Helfand i Bonomo 2003) (Slika 4).

Pojava rezistencije na antibiotike može se ograničiti na sljedeće načine: odžavanjem dovoljno visokog nivoa koncentracije antibiotika u tkivima, istovremenom primjenom dva ili više antibiotika prema kojima nema križne rezistencije, ili ograničavanjem primjene antibiotika u humanoj medicini. Osim specifične osjetljivosti pojedinih uzročnika i mogućeg razvoja rezistencije, na aktivnost beta-laktamskih antibiotika utječe brojnost bakterija na mjestu infekcije i dužina trajanja infekcije (Andrašević i sur 2009).

MEHANIZMI REZISTENCIJE NA PENICILINE I CEFALOSPORINE



Slika 4. Mehanizmi rezistencije na antibiotike (preuzeto iz: „Priručnik o postupcima kontrole infekcija“, Damani 2004)

1.3. Beta-laktamaze

Beta-laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom razgrađuju amidnu vezu u beta-laktamskom prstenu penicilina, cefalosporina i monobaktama, stvarajući kiselinske derivate bez antibakterijske aktivnosti. Stvaranje beta-laktamaza predstavlja glavni mehanizam rezistencije bakterijskih patogena na beta-laktamske antibiotike (Jacoby 2005).

Osnovni mehanizam djelovanja je u skladu sa reakcijskom shemom: $E+S=ES$. Beta-laktamaze razaraju beta-laktamski prsten na dva načina. Prvo aktivno serinsko mjesto enzima nekovalentno vežu s antibiotikom stvarajući nekovalentni Michaelisov kompleks. U toj reakciji se nikakve veze ne stvaraju niti kidaju. Nakon toga se hidroksilna skupina aktivnog serinskog mjesta enzima veže za beta-laktamski prsten antibiotika stvarajući kovalentni kiseli ester. Na kraju se hidrolizom estera oslobađa aktivni enzim i neaktivni antibiotik (beta-laktam sa otvorenim prstenom koji više nema antibakterijske aktivnosti). Nakon enzimatske hidrolize produkti podliježu spontanoj degradaciji. Manji broj beta-laktamaza (npr. metalo-beta-laktamaze) inaktiviraju beta-laktamski prsten pomoću iona cinka vezanog za histidinski ili cisteinski ostatak. Beta-laktamaze spadaju u fleksibilne enzime jer nemaju rigidnu tercijarnu

strukturu i zbog toga su primarni kandidati za enzime koji udovoljavaju „induce fit“ modelu, a to znači da supstrat ima sposobnost da inducira konformacijske promjene u enzimu, tj. da se aminokiselinski ostaci u aktivnom mjestu enzima prostorno orijentiraju tako da može doći do katalize (Helfand i Bonomo 2003).

Supstratni profil je termin kojim se označava hidrolitička aktivnost enzima prema nekom beta-laktamskom antibiotiku. Taj parametar obilježava spektar aktivnosti enzima. S obzirom na njega, beta-laktamaze dijelimo u penicilinaze, cefalosporinaze i enzime širokog spektra (Pitout i sur. 2005).

Molekularna masa beta-laktamaza kreće se između 14000 i 49000 Da. To su enzimi koji su u Gram-negativnim bakterijama smješteni u periplazmatskom prostoru i napadaju antibiotik prije nego on dođe do ciljnog mjesta. Kod Gram-pozitivnih bakterija smještene su ekstracelularno, ili su adherirane za citoplazmatsku membranu. Do sada je otriveno više od 340 beta-laktamaza koje se razlikuju po slijedu aminokiselina i fenotipskim obilježjima a dijele se u skupine ovisno o afinitetu vezanja za supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini enzima u bakteriji, te propusnosti membrane bakterija (Livermore 1995).

1.2.1 Klasifikacija beta-laktamaza

Klasifikacija beta-laktamaza predstavlja velik problem i postoji ih nekoliko. One se temelje ili na funkcionalnim ili molekularnim obilježjima. U zadnje vrijeme najčešće se koriste funkcionalna klasifikacija po K. Bush iz 1995. godine (Bush-Jacoby-Medeiros klasifikacija) (Tablica 1), te molekularna klasifikacija po Ambleru iz 1980. godine, jer pokazuju najveća preklapanja. Neki od parametara prema kojima se vrši funkcionalna klasifikacija su: supstratni profil, osjetljivost enzima na inhibitore, izoelektrična točka enzima, molekularna težina i dr., dok klasifikacija prema Ambleru razvrstava beta-laktamaze na temelju sekvencije aminokiselina. Obje klasifikacije dijele beta-laktamaze u 4 skupine.

Prema klasifikaciji po Ambleru beta-laktamaze su podijeljene u četiri grupe označene slovima A, B, C i D. Enzimi iz skupine A, C i D su evolucijski različite serinske beta-laktamaze. U skupinu A spada penicilinaza *Staphylococcus aureus* i većina beta-laktamaza širokog (TEM-1, TEM-2, SHV-1) i proširenog (ESBL) spektra. U skupini B su metalo-beta-laktamaze.

Skupinu C čine cefalosporinaze, a skupinu D čine enzimi koji hidroliziraju oksacilin (Samaha-Kfoury i Araj 2003).

Prema klasifikaciji po Bush skupina 1 uključuje cefalosporinaze koje ne inhibira klavulanska kiselina, a spadaju u molekularnu grupu C. Skupina 2 obuhvaća penicilinaze, cefalosporinaze i beta-laktamaze koje su i jedno i drugo, a koje se inhibiraju klavulanskom kiselinom, a molekularno spadaju u grupu A ili D. Skupina 2 podijeljena je u podskupine od a do f, to tako da podskupina 2a obuhvaća samo penicilinaze, podskupina 2b obuhvaća beta-laktamaze širokog spektra, penicilinaze i cefalosporinaze, (podskupina 2be obuhvaća beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), te podskupina 2br koja obuhvaća enzime koji nisu inhibirani klavulanskom kiselinom i sulbaktamom ali su podložni tazobaktamima), podskupina 2c su enzimi koji su otporniji na karbenicilin više nego na benzilpenicilin, podskupina 2e su enzimi cefalosporinaze koji hidroliziraju i monobaktame te su inhibirani klavulanskom kiselinom, podskupina 2f su karbapenemaze koje u svom aktivnom mjestu imaju serin umjesto iona cinka i tu spadaju i enzimi proširenog spektra. U skupinu 3 spadaju metalo-beta-laktamaze (karbapenaze) koje sadrže cink, a molekularno spadaju u grupu B. Dok se u skupinu 4 ubrajaju penicilinaze koje nisu inhibirane klavulanskom kiselinom, a ne ubrajaju se još ni u jednu molekularnu klasu (Bush i sur. 1995).

Tablica 1. Klasifikacija beta-laktamaza prema Bush

(preuzeto sa: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v75/full/75130303.html>)

Functional group	Subgroup	Molecular class	Main substrate	Peculiarities of beta-lactamase members
1	1	C	all groups of beta-lactam antibiotics except carbapenems	chromosome-encoded AmpC beta-lactamases, some plasmid-encoded AmpC beta-lactamases — are not inhibited by clavulanic acid
2	2a	A	penicillins	penicillinases of Gram-positive bacteria — are inhibited by clavulanic acid
	2b	A	penicillins, cephalosporins	broad spectrum beta-lactamases (TEM-1, TEM-2, SHV-1) — are inhibited by clavulanic acid
	2be	A	penicillins, cephalosporins, monobactams	extended spectrum beta-lactamases (ESBL) — are inhibited by clavulanic acid
	2br	A	penicillins	inhibitor-resistant beta-lactamases of TEM and SHV types
	2c	A	penicillins, carbenicillin	carbenicillin-hydrolyzing PSE type beta-lactamases
	2e	A	cephalosporins	inducible cephalosporins from <i>Proteus</i> spp. — are inhibited by clavulanic acid
	2f	A	penicillins, cephalosporins, carbapenems	serine carbapenemases — are inhibited by clavulanic acid
	2d	D	penicillins, oxacillin	OXA type beta-lactamases hydrolyzing oxacillin — are mainly inhibited by clavulanic acid
3	3a, 3b, 3c	B	most beta-lactams, including carbapenems	metallo-beta-lactamases — are not inhibited by clavulanic acid but are inhibited by EDTA
4	not determined		penicillins	penicillinases not belonging to other groups

S obzirom na inducibilnost, beta-laktamaze mogu biti: inducibilne ili konstitutivne. Konstitutivne su one koje se stvaraju bez obzira na izloženost beta-laktamskim antibioticima, a u kontaktu s antibioticima se njihova količina može manje ili više povećati, dok su inducibilne one koje se stvaraju kada bakterija dođe u kontakt s beta-laktamskim spojem. Konstitutivne beta-laktamaze su dokazane kod sojeva *E. coli*, *Bacteroides* sp., *Shigella* spp. i *Salmonella*. Inducibilne beta-laktamaze su odgovorne za pojavu rezistencije na beta-laktamske antibiotike velikog broja Gram-negativnih i nekih Gram-pozitivnih uzročnika. Bazalna ekspresija takvih enzima je obično vrlo niska, ali u prisustvu beta-laktamskog antibiotika dolazi do višestrukog povećanja aktivnosti. Sinteza beta-laktamaze može biti inducirana beta-laktamskim substratima, inhibitorima beta-laktamaze ili supstancama koje nisu ni supstrati ni inhibitori. Inducibilne beta-laktamaze su otkrivene kod sojeva iz roda: *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia* spp. i *Aeromonas* spp. Uzrokuju multiplu rezistenciju na beta-laktamske antibiotike koja uključuje većinu novih cefalosporina, cefamicine, monobaktame, kao i peniciline širokog spektra.

Inducibilne beta-laktamaze Gram-negativnih bakterija su isključivo kromosomske beta-laktamaze. Genska regulacija sinteze beta-laktamaza je pod kontrolom nekoliko Amp gena. AmpC gen je strukturni gen koji kodira produkciju beta-laktamaza. Inducibilnost ovisi o prisutnosti drugog gena koji se naziva AmpR gen. AmpR je regulatorni gen koji inhibira transkripciju AmpC gena. Produkt AmpR gena je protein molekularne težine od 31000 Da. Produkt AmpR gena djeluje kao aktivator za vrijeme indukcije, te kao represor u neinducirajućim okolnostima. Sekundarni regulatorni gen je AmpD i njegov produkt vrši represiju transkripcije AmpC gena. Utvrđeno je da AmpD protein spada u skupinu DNA-vezujućih proteina. Treći regulatorni gen je AmpE. On djeluje kao senzor za sistem koji otpočinje indukciju beta-laktamaza. Oštećenja ili mutacije tog gena rezultiraju u neinducibilnom ili slabo inducibilnom fenotipu. Indukcija beta-laktamaza se nalazi pod kontrolom represorskog mehanizma, a beta-laktamske molekule mogu stupati u interakciju s represorskim proteinom u stanici. Indukcija je privremeni događaj koji nastaje kada induktor formira kompleks s AmpD proteinom, što sprečava interakciju AmpD i AmpR proteina. Za razliku od indukcije, genska represija je permanentan fenomen a nastaje zbog sinteze defektnog AmpD proteina koji se ne može vezati na AmpR protein. Indukcija je reverzibilan događaj koji prestaje nakon uklanjanja induktora (Yen Tan i sur. 2008, Jacoby 2009).

S obzirom na genetsku osnovu, beta-laktamaze dijelimo na kromosomske i plazmidne. Kromosomske su kodirane genima bakterijskog kromosoma i nalaze se samo u nekim

bakterijskim vrstama, dok su plazmidne pod kontrolom gena plazmida, a s obzirom da se plazmidni geni vrlo lako i često prenose među raznim bakterijama (konjugacijom ili transdukcijom), tako su i plazmidne beta-laktamaze znatno raširenije među bakterijama. Sve plazmidno kodirane beta-laktamaze su konstitutivne i sintetiziraju se u većini slučajeva u većim količinama od kromosomalnih (Jacoby 2009).

Prva plazmidno kodirana beta-laktamaza izolirana je u Grčkoj 1965. godine i nazvana TEM-1 po početnim slovima imena osobe iz čije je hemokulture izolirana. Smještena je na transpozonu Tn3 koji se često konjugacijom prenosi među bakterijama i to je omogućilo da se u svega nekoliko godina od prve izolacije proširi svijetom. Danas je TEM-1 raširena u 20-60% enterobakterija (Yen Tan i sur. 2008).

Druga vrsta koja se najčešće nalazi u sojevima bakterija *K. pneumoniae* i u *E. coli* je SHV-1.

Osamdesetih godina prošlog stoljeća u terapiju infekcija uzrokovanih Gram-negativnih bakterija uvedeni su cefalosporini proširenog spektra djelovanja, no ubrzo nakon toga u Njemačkoj je otkriven i enzim koji uzrokuje rezistenciju na tu skupinu antibiotika, i nazvan je SHV-2, jer je uočeno da je nastao mutacijom enzima SHV-1 iz *Klebsielle*.

1.2.2 Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL)

Beta-laktamaze proširenog spektra su plazmidno kodirani enzimi nastali točkastom mutacijom u bla_{TEM-1} , bla_{TEM-2} ili bla_{SHV-1} genu. Takve mutacije mijenjaju strukturu aktivnog središta i šire supstratni spektar enzima. Većina takvih mutacija se događa prilikom upotrebe cefalosporina treće generacije koji vrše selekcijski pritisak i omogućavaju preživljavanje mutantima (Pettersen i sur. 1997).

Treća porodica ESBL su CTX-M beta-laktamaze koje su nativne ESBL i nisu nastale mutacijama. Nastale su od kromosomskih beta-laktamaza vrsta *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana* i pokazuju bolju hidrolitičku aktivnost prema cefotaksimu nego prema cefazidimu za razliku od TEM i SHV beta-laktamaza.

Geni koji kodiraju ESBL nalaze se na mobilnim genetičkim elementima što pospješuje njihovo širenje među bakterijama. Produciraju ih neki Gram-negativni bacili a uzrokuju rezistenciju na peniciline, starije cefalosporine, cefalosporine proširenog spektra te

monobaktame. Ne djeluju na cefamicine i karbapeneme. ESBL sojevi pripadaju molekularnoj klasi A ili D beta-laktamaza te hidroliziraju oksimino cefalosporine, u svom aktivnom mjestu imaju serin i inhibirani su inhibitorima beta-laktamaza (klavulanska kiselina, sulbaktam, tazobaktam). Po klasifikaciji Bush-Jacoby-Medeiros, ESBL bakterije su svrstane u dvije podskupine skupine 2; podskupinu 2be koja uključuje uglavnom bakterije ESBL proizašle iz TEM i SHV enzima te podskupinu 2d u koju spadaju enzimi koji su derivati OXA enzima (Livermore 1997).

Bakterije koje luče ESBL su tipično multiplo rezistentne zato što se geni koji su odgovorni za druge mehanizme rezistencije često prenose na istom plazmidu kao i ESBL gen. Ostale skupine multiplo rezistentnih bakterija su: MRSA – meticilin/oxacilin rezistentni *Staphylococcus aureus*, VRE – vankomicin rezistentni enterokoki, te PRSP – pecinilin rezistentni *Streptococcus pneumoniae* (Pitout i sur. 2005).

Najvažniji patogeni koji stvaraju ESBL su sojevi *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* i *Acinetobacter* spp.

Beta-laktamaze proširenog spektra se dijele se u tri skupine: derivate TEM, SHV i CTX-M beta-laktamaze. Najveći broj ESBL-a svrstan je u TEM skupinu koja sadrži više od 130 enzima, SHV skupinu sa više od 50 enzima te CTX-M skupinu isto sa više od 50 enzima (Bradford 2001).

1.2.2.1 TEM beta-laktamaze

TEM tipovi beta-laktamaza proširenog spektra derivati su enzima TEM-1 i TEM-2, u kojima je došlo do točkaste mutacije u genu *bla*_{TEM}. Prema Bush-Jacoby-Medeiros klasifikaciji spada u grupu 2b. TEM beta-laktamaze odgovorne su u više od 90% slučajeva za rezistenciju *E. coli* na ampicilin, te za rezistenciju sojeva *N. gonorrhoeae* i *H. influenzae* na penicilin i ampicilin. TEM-1 hidrolizira peniciline i starije cefalosporine, a inhibirana je klavulanskom kiselinom. Do sada ih je poznato oko 130 vrsta. Najčešće ih nalazimo u vrstama *E.coli* i *K. pneumoniae*, no nalaze se i u ostalih rodova porodice *Enterobacteriaceae*.

Beta-laktamaza TEM-2, nastala je od TEM-1, a razlikuje se u supstituciji glicina lizinom na poziciji 39 polipeptidnog lanca. Supstitucija aminokiselina unutar TEM skupine javlja se na ograničenom broju položaja (jedna od sedam aminokiselinskih supstitucija).

Daljnim modifikacijama TEM beta-laktamaza, tijekom 20. stoljeća pojavile su se mutirane vrste koje nisu ESBL, ali su rezistentne na djelovanje inhibitora beta-laktamaza (tzv. IRT fenotip) (Jacoby 2001).

1.2.2.2 SHV beta-laktamaze

SHV-1, nađena je kod bakterija *K. pneumoniae* i *E.coli* ali prisutna je i kod drugih Gram-negativnih bakterija. Kod *K. pneumoniae* gen bla_{SHV-1} integriran je u bakterijski kromosom dok se kod *E.coli* nalazi na plazmidu. Po svojoj strukturi SHV-1 je u 68% slijeda aminokiselina identična TEM-1. Prva SHV beta-laktamaza s ESBL fenotipom, SHV-2, opisana je 1983. u izolatu *K.ozenae* iz Njemačke. SHV beta-laktamaze nisu tako raznolike kao TEM, ima ih manje, te se točkaste mutacije unutar bla_{SHV} gena koje dovode do novih SHV varijanti odvijaju unutar manjeg broja pozicija nego što je slučaj s TEM beta-laktamazama. Najveći broj SHV beta-laktamaza ima karakterističnu zamjenu glicina serinom na položaju 238. Serin na položaju 238 enzima SHV-1 je važan za učinkovitu hidrolizu ceftazidima dok je lizin važan za hidrolizu cefotaksima. Uzrokuju i rezistenciju na ampicilin. Do sada ih je nađeno oko 50 alelskih varijanti i sve pokazuju ESBL fenotip. Iako većinu ESBL tipa SHV luče sojevi *K. pneumoniae*, takva vrsta enzima dokazana je i u sojeva *E. coli*, *Citrobacter diversus* i *P. aeruginosa* (Paterson i sur. 2003).

1.2.2.3 CTX-M beta-laktamaze

CTX-M je relativno novija skupina ESBL koja hidrolizira cefalotin ili cefaloridin bolje od benzilpenicilina te dobro hidrolizira cefotaksim i ceftriakson a slabo ceftazidim. Tazobaktam ih deseterostruko jače inhibira od klavulanske kiseline. Smatra se da je za takav fenotip odgovoran serin na poziciji 237 opisan kod svih CTX-M enzima, te konformacijske promjene $\beta 3$ lanca i Ω petlje u odnosu na ostale beta-laktamaze klase A. Bakterije koje produciraju CTX-M beta-laktamaze često su rezistentne na inhibitore beta-laktamaza zbog paralelne

produkcije inhibitor rezistentnih penicilinaza (npr. OXA-1), koje mogu biti kodirane na istom plazmidu. CTX-M enzimi su potekli od kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterijske vrste *Klyvera ascorbata* horizontalnim prijenosom gena i posljedičnom mutacijom. CTX-M beta-laktamaze pokazuju 40% homologije s TEM I SHV beta –laktamazama. Do danas je poznato oko 50 vrsta, podijeljenih u 5 skupina (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25). Najčešće ih luče sojevi *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* i *E. coli* ali su opisane i u drugih vrsta enterobakterija (Pitout i sur. 2005).

1.2.3 Karbapenemaze

Karbapenemi se razlikuju od penicilina po tome što imaju nezasićenu vezu između C2 i C3 atoma na poziciji 1 tiazolidinskog prstena. Oni se međusobno razlikuju po konfiguraciji postraničnog lanca na C2 i C6-atomu. Hidroksietilni lanac na položaju C6 u trans-konfiguraciji daje izrazitu stabilnost prema beta-laktamazama. Njihova velika djelotvornost *in vitro* je rezultat dobre penetracije kroz vanjsku membranu Gram-negativnih bakterija, visokog afiniteta za PBP molekule, te stabilnosti prema beta-laktamazama. Vežu se za PBP-1 i PBP-2 molekule i izazivaju stvaranje sferoplasta i lizu stanica bez stvaranja filamenata (Bedenić 2005).

U karbapeneme se ubrajaju imipenem, meropenem, ertapenem i doripenem. Meropenem je u odnosu na imipenem slabije aktivan prema Gram-pozitivnim bakterijama, ali je zato djelotvorniji prema Gram-negativnim bakterijama, posebno prema enterobakterijama. Otporni su na: ESBL (TEM, SHV, CTX-M), plazmidne AmpC-laktamaze (FOX, MOX), te na kromosomske cefalosporinaze Gram-negativnih bakterija. Indukcija beta-laktamaza uzrokuje antagonizam prema penicilinima i cefalosporinima ako se primjenjuje s njima u kombinaciji.

Dereprimirani mutanti koji proizvode konstitutivno velike količine beta-laktamaza zbog genske mutacije obično su rezistentni na peniciline i cefalosporine širokog spektra, ali zadržavaju osjetljivost prema imipenemu (Pettersen i sur. 1997).

Otpornost karbapenema prema beta-laktamazama nije potpuna. Metallo-beta-laktamaze molekularne grupe B koje sadržavaju cink kao kofaktor mogu hidrolizirati karbapeneme. Prvi takav enzim nazvan je IMP-1 i prvi put je opisan kod *P. aeruginosa*. On dovodi do rezistencije na sve beta-laktame osim monobaktama. Karbapenemaze koje uzrokuju stečenu

rezistenciju na karbapeneme spadaju u grupe A, B i D po Ambleru. U grupi A nalaze se karbapenemaze koje su inhibirane klavulanskom kiselinom, a pojavljuju se rijetko. Pripadaju u grupu 2f po K. Bush. Mogu biti kodirane kromosomski ili plazmidno. Karbapenemaze grupe B su klinički najznačajnije karbapenemaze. To su metalo- β -laktamaze iz IMP ili VIM serije (do danas su se pojavile i nove porodice kao što su GIM, SPM, NDM, DIM, SIM...). Pojavljuju se u čitavom svijetu a kodirane na plazmidima i integronima. Hidroliziraju gotovo sve beta-laktame osim aztreonama. Nisu inhibirane klavulanskom kiselinom ili sulbaktamom ali su inhibirane kelatorima metalnih iona (EDTA). Karbapenemaze grupe D slabo hidroliziraju imipenem i meropenem, ne razgrađuju cefalosporine proširenog spektra i aztreonam. Neke su inhibirane klavulanskom kiselinom (osim OXA-23), te su rezistentne na inhibiciju s metalnim kelatorima (EDTA). Najvažnije grupe su: OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 i OXA-143 (Woodford i sur. 2006).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je:

- odrediti prevalenciju beta-laktamaza proširenog spektra u enterobakterija urinarnih izolata od izvanbolničkih i bolničkih pacijenata skupljenih u Kantonalnoj bolnici Zenica, u Bosni i Hercegovini, tijekom 2009. i 2010. godine,
- odrediti osjetljivost bakterija na različite antibiotike,
- tipizirati beta-laktamaze proširenog spektra umnažanjem i sekvenciranjem *bla* ESBL gena,
- odrediti genetsko podrijetlo *bla* ESBL gena karakterizacijom plazmida.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Sojevi

Za israživanje je korišten 121 uzorak urina, od čega 56 bolničkih i 65 izvanbolničkih. Uzorci su skupljani u Kantonalnoj bolnici Zenica, u Bosni i Hercegovini, u periodu od prosinca 2009. do srpnja 2010. godine. Dobiveni su od bolesnika oba spola i različitih dobnih skupina. U uzorcima su nađene bakterije iz rodova *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (Tablica 2).

Sojevi su identificirani standardnim biokemijskim testovima, te pohranjeni u ubodnom agaru za pohranjivanje sojeva (1,5% hranjivi agar) na 4 °C.

Tablica 2. Vrste bakterija.

VRSTA BAKTERIJA	IZVANBOLNIČKI URINI	BOLNIČKI URINI	UKUPNO UZORAKA
<i>E. coli</i>	16	8	24
<i>K. pneumoniae</i>	22	27	49
<i>P. mirabilis</i>	7	7	14
<i>Citrobacter</i> spp.	6	6	12
<i>Enterobacter</i> spp.	4	3	7
<i>M. morgani</i>	3	0	3
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	2
<i>A. baumannii</i>	3	0	3
Ostali	2	5	7
Ukupno	65	56	121

3.2. Testiranje osjetljivosti na antibiotike

3.2.1 Disk difuzijski test

Disk difuzijski test izveden je Kirby-Bauerovom metodom na Mueller-Hinton agaru. Sojevi su suspendirani u fiziološkoj otopini, a gustoća inokuluma je podešena prema standardnoj McFarland suspenziji 0,5 tako da je dobiven semikonfluentni rast nakon inokulacije 100 µl suspenzije na Mueller-Hintonovom agaru. Na ploče su postavljeni diskovi antibiotika te je slijedila inkubacija na 37 °C 18 sati u aerobnim uvjetima. Nakon toga su očitavane inhibicijske zone. Na osnovu širine inhibicijske zone (mjerjenje u milimetrima) određeno je li ispitivani soj osjetljiv, umjereno osjetljiv ili rezistentan. Osjetljivost je označavana slovom S (*engl. sensitive*), umjerena osjetljivost slovom I (*engl. intermediate*) i otpornost soja slovom R (*engl. resistant*). Posebna pažnja je usmjerena na standardiziranje veličine inokuluma jer prerijetka suspenzija daje lažno veće inhibicijske zone, dok pregusta suspenzija daje lažno manje inhibicijske zone. Također se pazilo da diskovi budu dovoljno udaljeni jedan od drugoga i od ruba ploče da se može pravilno izmjeriti promjer bez preklapanja zona (Watts i sur. 2007). Korišteni su slijedeći antibiotici: amoksicilin (25 µg, Becton-Dickinson), amoksicilin/klavulanat (20+10 µg, Becton-Dickinson), piperacilin (100 µg, Becton-Dickinson), cefaleksin (30 µg, Becton-Dickinson), cefazolin (30 µg, Becton-Dickinson), cefuroksim (30 µg, Becton-Dickinson), cefoperazon (30 µg, Becton-Dickinson), ceftazidim (30 µg, Becton-Dickinson), cefotaksim (30 µg, Becton-Dickinson), ceftriakson (30 µg, Becton-Dickinson), cefoksitin (30 µg, Becton-Dickinson), imipenem (10 µg, Becton-Dickinson), gentamicin (10 µg, Becton-Dickinson), amikacin (30 µg, Becton-Dickinson), rifampicin (5 µg, Becton-Dickinson), nalidiksična kiselina (30 µg, Becton-Dickinson), norfloksacin (10 µg, Becton-Dickinson), ofloksacin (5 µg, Becton-Dickinson), pefloksacin (5 µg, Becton-Dickinson) i ciprofloksacin (5 µg, Oxoid) (Tablica 3).

Tablica 3. Kratice antibiotika.

Kratice antibiotika	Naziv antibiotika
CAZ	ceftazidim
CRO	ceftriakson
CXM	cefuroksim
CIP	ciprofloksacin
CTX	cefotaksim

Tablica 3. nastavak

Kratica antibiotika	Naziv antibiotika
FEP	cefepim
FOX	cefoksitin
IPM	imipenem
TZB	piperacilin/tazobaktam
MEM	meropenem
PIP	piperacilin
GM	gentamicin
AMXC	amoksicilin
AMC	amoksicilin/klavulanska kiselina

3.2.2 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)

Minimalne inhibitorne koncentracije određene su metodom mikrodilucije u mikrotitar pločicama sa dvostrukim razrjeđenjima. Korišten je Mueller-Hinton bujon, a veličina inokuluma je bila 10^5 bakterijskih stanica po mililitru. Antibiotici razliveni u mikrotitar pločicama čuvani su do upotrebe na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, osim imipenema, karbapenema i amoksicilina u kombinaciji s klavulanskom kiselinom koji su svježe pripremani na dan izvođenja testa.

MIK se definira kao najniža koncentracije antibiotika koja će spriječiti vidljiv porast bakterija nakon inkubacije od 18 sati na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uvjetima (Watts i sur. 2007). Supstance su dobivene od slijedećih proizvođača: amoksicilin (Pliva, Zagreb), klavulanat (SmithKline, Beecham, Brockham Park), cefaleksin (Pliva, Zagreb), cefuroksim (Pliva, Zagreb), ceftazidim (Pliva, Zagreb), cefotaksim (Hoechst AG, Frankfurt, Main), ceftriakson (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen), cefetamet (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen), ceftibuten (Schering-Plough-Corporation), aztreonam (Bristol Myers Squibb, Muenchen), cefotetan (Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield), imipenem (MSD, Muenchen), nalidiksična kiselina (Pliva, Zagreb), gentamicin (Pliva, Zagreb) i rifampicin (Pliva, Zagreb). Antibiotici su otapani u odgovarajućim koncentracijama: amoksicilin, klavulanska kiselina, ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson, cefaleksin, cefaklor, cefuroksim, cefpirom, ceftibuten, cefmenoksim, cefetamet, aztreonam, imipenem i cefotetan u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7), gentamicin u fiziološkoj otopini, nalidiksična kiselina u 1 M natrijevoj lužini i rifampicin u metanolu. Aztreonam,

ceftibuten i imipenem su profiltrirani kroz Millipore filter (promjer pora 0,2 µm) nakon otapanja. Imipenem se razrijeđuje 1:10 u sterilnoj fiziološkoj otopini.

Antibiotici su pripremani u 12 različitih koncentracija, i to u rasponu od 0,25 µg/ml do 256 µg/ml, te su naneseni u volumenu od 50 µl. Obično se karbapenemi pripremaju u rasponu od 0,06 do 128 mg/L jer imaju niske MIK-ove.

Veličina inokuluma je podešena prema standardnoj Mc Farlandu 0,5 suspenziji i kasnije razrijeđivana tako da se dobije 5×10^5 CFU/ml (colony-forming unit). Pločice su inkubirane preko noći na 37°C i zatim su očitavani rezultati. Koncentracija antibiotika u prvoj jažici u kojoj je bujon ostao bistar odgovara za MIK (minimalnu inhibitornu koncentraciju). Izražava se u µg/ml ili mg/l). Kao referentni soj za testiranje osjetljivosti na antibiotike je korištena *E. coli* ATCC 25922 i *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Zamućeni bujon u jažici interpretirao se kao otpornost bakterija (koncentracija antibiotika nije bila dovoljno visoka da spriječi umnažanje bakterija). Bistri bujon interpretirao se kao osjetljivost bakterija (koncentracija antibiotika je bila dovoljno visoka da spriječi umnažanje bakterija). MIK za određeni bakterijski soj odredio se uz pomoć konkavnog zrcala nalaskom prve jažice u nizu u kojoj je bujon ostao bistar, a koncentracija antibiotika u toj jažici odgovara vrijednosti MIK-a (Watts i sur. 2007).

3.2.3 Detekcija ESBL dvostrukim disk sinergističkim testom

Produkcija ESBL utvrđena je metodom dvostrukog diska. Prekonoćna kultura testiranog soja je razrijeđena tako da se postigne optička gustoća koja odgovara Mc Farland standardu 0,5 što odgovara za 10^8 CFU/ml. Bakterijska suspenzija inokulirana je na Mueller-Hinton agaru. U centar ploče postavljen je disk amoksicilin/klavulanske kiseline (30/10 µg), a na udaljenosti od 20 mm postavljeni su diskovi ceftazidima (30 µg), cefotaksima (30 µg), ceftriaksona (30 µg) i cefepima (30 µg). Nakon inkubacije 18 sati na 37 °C u aerobnim uvjetima prisutnost ESBL utvrđena je prisutnošću sinergizma (deformacija inhibicijske zone oko cefalosporinskih diskova u smjeru prema centralnom disku amoksicilina s klavulanskom kiselinom) (Apfalter i sur. 2007).

3.2.4 Detekcija ESBL - CLSI konfirmatorni test

Prekonoćna kultura testiranog soja je razrijeđena tako da se postigne optička gustoća koja odgovara Mc Farland standardu 0,5 što odgovara za 10^8 CFU/ml. Bakterijska suspenzija inokulirana je na Mueller-Hinton agaru. Postavljeni su diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima na jednu ploču, a na drugu ploču ti isti diskove s dodatkom klavulanske kiseline, koja se kapala na površinu svakog diska u koncentraciji od 10 000 mg/ml. Nakon inkubacije 18 sati na 37 °C u aerobnim uvjetima prisutnost ESBL utvrđena je ukoliko je inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču bez klavulanske kiseline (Taneja i Sharma 2008, Munier i sur. 2010).

3.2.5 Detekcija produkcije kromosomske AmpC beta-laktamaze

Bakterijska suspenzija je zasijana na Mueller-Hinton agar i postavljeni su diskovi cefalosporina proširenog spektra, te je nakapana fenilboronična kiselina na diskove u količini 10 µl. Kao kontrola su korištene iste pločice s antibioticima ali bez fenilboronične kiseline. Slijedila je inkubacija na 37 °C 18 sati u aerobnim uvjetima. Nakon toga su očitavane inhibicijske zone (Kenneth i Thomson 2010).

3.3. Prijenos rezistencije konjugacijom

Jedan od načina prijenosa rezistencije je metoda konjugacije. Kao recipijent korišten je soj *E. coli* A15R⁻, bez plazmida i rezistentan na rifampicin.

Suspenzije donora i recipijenta u Mueller-Hinton bujonu su inkubirane 18-24 sata. Nakon toga su kulture miješane u omjeru 2:1 te inkubirane 18 sati na 37 °C bez mućkanja. Kulture su zatim razrijeđene u fiziloškoj otopini i 50 µl razrijeđenja od 10^{-2} , 10^{-4} i 10^{-6} su zasijavane na McConkey koji je sadržavao ceftazidim (2 mg/l) i rifampicin (256 mg/l). Donor se zasijavao u istim razrijeđenjima na podlogu koja je sadržavala samo ceftazidim a recipijent na ploče s rifampicinom. Ceftazidim suprimira rast recipijenta a rifampicin rast donora.

Samo transkonjuganti mogu porasti na kombiniranoj ploči koja sadržava oba antibiotika. Frekvencija konjugacije se izražava relativno u odnosu na broj stanica donora (Kenneth i Thomson 2010).

Recipijent je laktoza negativan i rezistentan na rifampicin. Transkonjugant može pokupiti gen za razgradnju laktoze od donora i biti laktoza pozitivan tako da se preporuča biokemijska potvrda soja. Transkonugant je *E. coli* pa mora biti indol pozitivan za razliku od donora. *Klebsiella* ponekad stvara na podlozi s rifampicinom mutante koje su rezistentne na rifampicin.

3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom izvodila se na sojevima donora i na transkonjugantima. Uzorci za lančanu reakciju polimeraze pripremani su na slijedeći način: sterilnim vrhom se dotakne svježa kolonija bakterije s obične krute hranjive podloge (pepton, mesni ekstrakt, ekstrakt kvasca, natrijev klorid, agar, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francuska), te se suspendira u 0,5 ml sterilne destilirane vode. Stanice se liziraju grijanjem na 95 °C kroz 15 minuta. Reakcijska smjesa za lančanu polimeraznu reakciju sadržava slijedeće komponente: 25 µl PCR Master Mix (Roche) (25 U Taq DNA polymerase u 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.01%, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - svaki 0,4 mM), konačni pH 8.3), 20 µl vode, 3 µl uzorka izolata, 1 µl +1 µl (30 pmol/µl) početnice, te je ukupnog volumena 50 µl. Reakcijska smjesa se promiješa, kratko centrifugira te stavlja u termalni reaktor Biometra.

Za detekciju TEM beta-laktamaza korištene su početnice: 5'-CCA-ATG-CTT-AAT-CAG-TGA-GG-3' (OT4) i 5'-ATG-AGT-ATT-CAA-CAT-TTC-CG-3' (OT3) (Arlet i sur. 1995, Kruger i sur. 2004). Za detekciju SHV beta-laktamaza korištene su početnice: 5'-CGC-CGG-GTT-ATT-CTT-ATT-TGT-CGC-3' (MN-1) i 5'-TCT-TTC-CGA-TGC-CGC-CGC-CAG-TCA-3' (MN-2) (Nüesch-Inderbinnen i sur. 1996). Za detekciju CTX-M beta-laktamaza korištene su početnice: 5'-CCA-GCG-TCA-GAT-TTT-TCA-GG-3' i 5'-CGA-CGC-TAC-CCC-CTG-CTA-TT-3' (grupa 2) (Woodford i sur. 2005).

Reakcije su izvedene na aparatu GenAmp PCR system 9600 pod slijedećim uvjetima:

- Za detekciju TEM beta-laktamaza početna denaturacija je 5 minuta na 94 °C, 30 ciklusa od 30 sek na 94 °C, 60 sek na 55 °C i 60 sek na 72 °C, te elongacija 5 min na 72 °C,
- Za detekciju SHV i CTX-M beta-laktamaza početna denaturacija je 3 min na 94 °C, 35 ciklusa od 60 sek na 94 °C, 60 sek na 55 °C i 2 min na 72 °C, te elongacija 7 min na 72 °C.

Nakon amplifikacije uzorci su podvrgavani elektroforezi u 1% agaroznom gelu uz 1x TBE pufer (10 µl produkta i 3 µl loading pufera). DNA vrpce su vizualizirane na UV transiluminatoru nakon bojenja etidij bromidom. Za nanošenje uzoraka u gel koristio se „loading buffer“ koji sadrži 0,05 bromfenolnog plavila, 40% saharoze, 0,1 M EDTA i 0,5% natrij lauril-sulfat (SDS). Paralelno s uzorcima na svaki elektroforetski gel nanošen je marker za određivanje veličine DNA fragmenata XIV (Molecular weight marker) molekularne mase raspona od 100 do 1000 parova baza (Roche, Njemačka). Za TEM skupinu enzima se očekivala veličina fragmenta 858 pb, za CTX-M skupinu enzima 545 pb a za SHV skupinu 1016 bp.

3.4.1 Pročišćavanje PCR produkta

PCR produkt je pročišćen komercijalnim kitom: QIAquick PCR purification Kit (Quiagen), po koracima:

- Pipetirati 100 µl PB pufera (iz kita) i 20 µl PCR produkta u novu 1,5 ml reakcijsku tubu, homogenizirati temeljito i zarotirati kratko da se spusti na dno,
- Pipetirati 120 µl u QIAquick kolonu i centrifugirati kolonu smještenu u tubu iz kita (2 ml) na 10000 g u trajanju od 1 min,
- Odbaciti tekućinu koja je prošla kroz kolonu, vratiti QIAquick kolonu u istu tubu. Isprati kolonu s 750 µl PE pufera i centrifugirati na 10000 g 1 min,
- Ponovo odbaciti sadržaj tube, još jednom centrifugirati kolonu u istoj posudi, a zatim odbaciti sve osim kolone koja se stavi u čistu kivetu volumena 1,5 ml,
- Pipetirati 30 µl EB pufera (iz kita) u sredinu QIAquick kolone, ostaviti da stoji minutu, centrifugirati na 10000 g 1 min,
- Pročišćeni PCR produkt se može skladištiti na -20 °C.

4. REZULTATI

4.1. Prevalencija ESBL

Za istraživanje je korišten 121 uzorak urina, od čega 56 bolničkih i 65 izvanbolničkih. Za određivanje prevalencije ESBL među izolatima korištene su metode dvostrukog diska i metoda kombiniranih diskova. Rezultati su prikazani u Tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Metoda kombiniranih diskova za detekciju ESBL u izvanbolničkih izolata (ceftazidim (CAZ), ceftriakson (CRO), cefotaksim (CTX), cefepim (FEP)).

			kontrola				klavulanska kis.					boronična kis.				
Redni broj	Kompjuterski broj	Izolat	CAZ	CRO	CTX	FEP	CAZ	CRO	CTX	FEP	ESBL	CAZ	CRO	CTX	FEP	AmpC
1	7689/10	Acinet	35	35	35	35	35	35	36	40	N	36	36	36	40	N
2	26708/10	Kleb	15	10	0	16	34	32	32	34	P	15	12	12	17	N
3	18730/10	Enter	20	15	18	35	23	20	19	36	P	32	30	32	32	P
4	32143/10	Kleb	13	13	12	22	30	30	30	36	P	15	13	13	22	N
5	34660/10	E.coli	32	14	16	23	35	32	32	34	P	30	18	19	23	N
6	18645/10	Kleb	24	14	14	24	38	38	38	38	P	20	15	14	21	N
7	6735/10	E.coli	30	22	22	30	30	30	29	35	P	12	10	11	14	P
8	13421/10	E.coli*														
9	34041/10	Morga	18	14	13	21	32	32	30	24	P	26	19	18	24	P
10	30966/10	Pseud	20	10	10	22	30	30	32	30	P	25	18	13	23	P
11	26109/10	Kleb	10	10	10	17	28	28	30	32	P	14	13	13	17	N
12	36061/10	Prote	24	20	22	30	26	28	24	30	P	24	27	26	30	N
13	34002/10	Kleb	16	10	0	16	32	30	32	36	P	32	30	32	32	P
14	17965/10	Kleb	18	10	9	19	30	28	30	30	P	18	12	13	18	N
15	31768/10	Prot	18	12	10	18	32	32	30	27	P	19	10	12	18	N
16	28899/10	E.coli	22	10	10	17	28	28	28	29	P	22	11	11	17	N
17	15996/10	E.coli	14	9	9	17	30	30	30	32	P	20	11	11	18	N
18	28612/10	Citro	13	8	8	14	26	28	28	28	P	14	10	10	16	N
19	34803/10	E.coli	22	10	15	15	30	28	28	30	P	21	12	13	16	N
20	10336/10	Enter	14	10	10	17	30	28	28	29	P	16	12	12	17	N
21	7132/10	E.coli	15	0	0	14	31	32	34	32	P	17	32	34	19	P
22	31654/10	Kleb	14	0	0	17	26	27	30	28	P	15	12	12	19	P
23	17555/10	Kleb	17	14	0	28	32	34	36	31	P	26	22	20	34	P
24	30812/10	Citro	0	12	12	24	13	15	15	27	P	15	18	17	16	P
25	32033/10	Kleb	0	11	13	26	15	14	15	27	P	18	20	19	30	P
26	8441/10	Kleb	0	12	12	26	14	14	15	22	N	17	18	19	26	P
27	2209/10	Prot	0	10	12	26	13	14	14	22	P	15	18	17	26	P
28	10913/10	Prot	28	14	12	24	34	32	34	34	P	29	35	35	35	P
29	18965/10	Kleb	32	35	35	35	30	32	34	32	N	35	35	35	35	N
30	30956/10	Enter	0	0	0	22	26	15	11	28	P	0	11	11	19	P
31	15676/10	Citro	15	0	0	17	30	28	30	30	P	15	13	14	19	N
32	8020/10	Prot	14	10	9	20	30	31	31	32	P	14	14	15	20	P
33	3357/10	*	14	10	10	20	33	32	32	35	P	12	10	10	20	N
34	25756/10	Citro	14	13	11	31	14	11	11	33	N	20	29	24	32	P
35	12176/10	Kleb	12	0	0	15	17	27	29	30	P	19	10	12	19	P
36	05849/10	E.coli	0	0	0	16	20	22	23	30	P	15	10	10	16	N
37	6001/10	Kleb	12	0	0	17	16	10	10	30	P	16	10	10	14	N
38	19567/10	Kleb	24	20	25	29	24	18	18	32	N	24	28	30	33	P
39	17577/10	Kleb	21	16	18	30	21	20	20	30	N	23	23	21	27	P

Tablica 4. Nastavak

			kontrola				klavulanska kis.					boronična kis.				
Redni broj	Kompjuterski broj	Izolat	CAZ	CRO	CTX	FEP	CAZ	CRO	CTX	FEP	ESBL	CAZ	CRO	CTX	FEP	AmpC
40	8608/10	Citro	30	0	20	32	35	35	35	31	P	30	27	24	34	P
41	26304/10	Kleb	15	1	0	14	30	30	30	31	P	15	0	0	13	N
42	26853/10	Kleb	21	20	19	20	25	23	24	25	N	21	19	19	20	N
43	13455/10	E.coli	13	0	0	18	20	29	30	31	P	15	13	14	19	P
44	12190/10	Morga	0	18	14	18	18	26	26	27	P	10	16	16	21	N
45	17583/10	E.coli	15	10	9	19	19	30	30	30	P	16	13	13	20	N
46	103/10	*	19	18	18	30	19	19	20	27	N	22	23	23	30	P
47	18412/10	Kleb	14	13	13	24	14	15	15	24	N	18	19	19	28	P
48	34830/10	Kleb	14	0	0	14	20	28	28	33	P	14	0	0	16	N
49	7966/10	E.coli	13	8	8	16	18	28	29	27	P	15	10	9	17	N
50	31811/10	E.coli	12	0	0	12	30	30	30	30	P	12	0	0	12	N
51	8586/10	E.coli	32	34	35	36	34	37	40	36	N	30	34	34	34	N
52	36181/10	Prot	16	9	9	20	34	34	34	36	P	20	14	16	19	P
53	17499/10	Pseud	14	0	0	25	21	10	10	23	P	25	22	23	28	P
54	34785/10	E.coli	17	20	22	36	24	25	25	34	P	25	28	27	36	P
55	19502/10	Enter	0	0	0	15	22	18	20	20	P	0	0	0	15	N
56	13437/10	Morga	15	0	0	28	12	10	12	26	N	25	26	23	30	P
57	9802/10	Kleb	13	0	0	17	30	30	30	32	P	14	10	10	16	N
58	31338/10	Acinet	26	12	0	28	19	10	10	25	N	31	19	13	32	P
59	6264/10	E.coli	30	19	21	30	22	10	10	31	N	32	27	24	33	P
60	34000/10	E.coli	15	14	16	25	20	13	12	30	P	21	23	26	26	P
61	34012/10	Acinet	14	10	10	18	31	34	34	34	P	16	12	12	20	N
62	83863/10	Citro	30	27	26	32	35	34	34	38	P	34	35	38	36	P
63	6513/10	Kleb	0	13	13	22	27	28	32	33	P	0	10	12	18	N
64	33373/10	Prot	28	26	30	30	34	34	32	38	N	32	38	34	39	P
65	34176/10	Kleb	16	11	11	19	30	32	32	33	P	17	11	12	20	N

*Polja koja su prazna predstavljaju ili zagađene uzorke, ili nedostatak materijala, ali nisu neohodni za ukupno očitavanje rezultata

**Kratkice bakterija: *E.coli-Escherichia coli*, *Kleb-Klebsiella pneumoniae*, *Prot-Proteus mirabilis*, *Citro-Citrobacter spp.*, *Morga-Morganella morganii*, *Pseud-Pseudomonas aeruginosa*, *Acinet-Acinetobacter baumannii*

***stupac ESBL (p/n) predstavlja proizvodnju beta-laktamaza proširenog spektra određene bakterije, a AmpC (p/n) hiperprodukcije kromosomske ili plazmidne AmpC beta-laktamaze

Tablica 5. Metoda kombiniranih diskova za detekciju ESBL u bolničkih izolata (ceftazidim (CAZ), ceftrijakson (CRO), cefotaksim (CTX), cefepim (FEP)).

Redni broj	Kompjuterski broj	Izolat	kontrola				klavulanska kis.					boronična kis.				
			CAZ	CRO	CTX	FEP	ESBL	CAZ	CRO	CTX	FEP	AmpC	CAZ	CRO	CTX	FEP
1	34298/10	Kleb	12	0	0	11	P	26	27	27	28	N	11	0	0	10
2	15493/10	E.coli	9	0	0	16	P	30	31	31	31	P	15	10	7	15
3	27860/10	Kleb	13	8	8	18	P	31	32	34	33	N	14	10	10	22
4	16791/10	Kleb	12	0	0	10	P	28	27	28	30	N	10	0	0	9
5	19349/10	Kleb	12	0	0	15	P	28	29	31	31	N	13	9	9	15
6	9961/10	Enter	14	8	9	25	P	28	18	17	31	P	26	23	23	32
7	28029/10	Kleb	13	10	9	17	P	27	28	30	30	N	16	12	13	19
8	17515/10	Kleb	11	0	0	11	P	28	28	29	30	N	11	0	0	11
9	17521/10	Kleb	16	10	9	16	P	28	30	32	33	N	16	12	12	20
10	33796/10	Kleb	13	10	0	16	P	31	31	32	33	N	15	13	11	17
11	5857/10	Kleb	13	0	8	17	P	28	31	33	33	N	16	14	15	20
12	25292/10	E.coli	16	0	8	17	P	30	31	30	31	N	18	14	14	19
13	36649/10	*	15	0	0	15	P	31	33	34	35	N	18	12	12	18
14	16115/10	Kleb	12	0	0	12	P	29	28	26	36	N	12	0	0	14
15	14116/10	Kleb	25	12	15	23	N	26	12	12	27	P	29	22	16	26
16	6832/10	Prot	15	10	9	19	P	22	22	21	29	P	24	20	20	22
17	14929/10	E.coli	13	0	0	16	P	28	30	30	30	P	18	14	14	17
18	28364/40	Kleb	12	8	8	16	P	28	29	31	31	P	17	15	14	19
19	11580/10	Kleb	14	10	10	18	P	32	34	35	35	P	20	17	17	22
20	36492/10	*	13	12	8	16	P	28	29	30	31	P	18	15	16	20
21	36507/10	*	11	8	9	16	P	25	27	30	30	P	17	14	15	20
22	15401/10	Kleb	19	13	15	22	P	31	33	35	35	P	21	20	21	26
23	10470/10	Citro	16	12	9	18	P	33	34	34	33	P	21	18	17	22
24	27562/10	Citro	27	25	29	29	N	28	30	31	32	N	26	28	30	30
25	36912/10	*	25	20	20	27	N	23	22	24	32	N	25	24	24	32
26	28001/10	Citro	25	20	20	27	N	27	28	30	32	N	21	16	12	20
27	33831/10	Citro	18	13	9	28	P	23	22	21	31	P	24	18	15	22
28	19158/10	Kleb	17	10	10	20	P	27	30	30	31	N	16	11	11	18
29	34356/10	Enter	10	0	0	15	P	26	27	28	31	N	14	11	12	15
30	3502/10	E.coli	20	12	10	22	P	30	30	30	33	N	20	16	14	20

Tablica 5. Nastavak

Redni broj	Kompjuterski broj	Izolant	kontrola				klavulanska kis.				boronična kis.					
			CAZ	CRO	CTX	FEP	ESBL	CAZ	CRO	CTX	FEP	AmpC	CAZ	CRO	CTX	FEP
31	23484/10	Enter	13	8	0	20	P	26	25	28	31	P	20	17	16	21
32	5745/10	E.coli	15	7	0	18	P	32	30	32	32	P	15	20	21	24
33	17872/10	Kleb	15	0	0	10	P	28	29	28	30	N	12	0	0	12
34	17866/10	Kleb	11	0	0	13	P	28	28	29	30	N	12	0	0	12
35	36003/10	Kleb	10	0	7	15	P	28	29	30	31	P	17	15	16	19
36	33825/10	Citro	13	7	7	20	P	26	30	31	30	P	17	16	16	20
37	14122/10	Kleb	15	0	0	13	P	29	28	30	28	N	14	9	0	14
38	19146/10	Kleb	10	0	0	10	P	28	28	28	29	N	10	0	0	9
39	6858/10	Prot	13	10	0	38	P	24	24	22	30	P	25	16	12	22
40	8084/10	E.coli	10	25	20	25	P	31	31	31	33	P	10	8	16	30
41	2685/10	Kleb	10	7	0	18	P	8	0	0	15	N	12	11	10	16
42	29002/10	Kleb	12	0	0	15	P	27	30	28	30	N	12	10	11	17
43	30723/10	E.coli	15	0	0	14	P	28	28	28	30	N	16	8	0	12
44	28395/10	Kleb	0	10	10	19	P	11	11	11	27	P	34	25	24	13
45	25286/10	Kleb	16	10	10	18	P	28	28	30	31	P	20	18	19	22
46	36155/10	*	14	0	0	17	P	28	30	31	33	P	18	16	16	20
47	35984/10	Kleb	26	18	16	24	P	25	28	28	28	P	28	25	25	28
48	19357/10	Kleb	13	0	0	11	P	28	28	28	25	P	18	14	12	17
49	10396/10	Kleb	15	8	10	17	P	28	30	30	28	N	13	10	11	16
50	24745/10	Citro	15	14	18	31	N	13	14	13	32	P	24	24	24	34
51	9314/10	Prot	13	0	10	18	P	30	34	34	34	N	15	10	12	18
52	7189/10	Prot	14	14	0	18	P	21	19	17	29	P	22	17	16	19
53	15495/10	Prot	14	0	8	30	N	16	13	14	32	P	28	24	24	35
54	7267/10	Prot	12	14	10	20	P	21	19	17	30	P	25	17	15	19
55	18590/10	E.coli	24	16	14	22	P	36	34	36	36	N	24	13	15	23
56	26351/10	Prot	14	13	0	20	P	22	21	18	32	P	25	14	13	18

* Polja koja su prazna predstavljaju neodređene vrste bakterija

**Kratkice bakterija: E.coli-*Escherichia coli*, Kleb-*Klebsiella pneumoniae*, Prot-*Proteus mirabilis*, Citro-*Citrobacter* spp., Morgia-*Morganella morgani*, Pseud-*Pseudomonas aeruginosa*, Acinet-*Acinetobacter baumannii*

***stupac ESBL(p/n) predstavlja proizvodnju beta-laktamaza proširenog spektra određene bakterije, a AmpC (p/n) hiperprodukcije kromosomske ili plazmidne AmpC beta-laktamaze

Proizvodnja beta-laktamaza proširenog spektra (ESBL) je kod izvanbolničkih izolata bila pozitivna u 50 od 65 uzoraka, tj. prevalencija bila je 77%, dok je kod bolničkih izolata bilo pozitivno u 50 od 56 uzoraka, što je prevalencija od 89% (Tablice 6 i 7).

Tablica 6. Prevalencija ESBL izvanbolničkih izolata.

Vrsta bakterije	ESBL +	ESBL -	Ukupno
<i>K. pneumoniae</i>	16 (73%)	6	22
<i>E. coli</i>	13 (81%)	3	16
<i>Enterobacter</i> spp	4 (100%)	0	4
<i>M. morgani</i>	2 (67%)	1	3
<i>P. aeruginosa</i>	2 (100%)	0	2
<i>P. mirabilis</i>	6 (86%)	1	7
<i>Citrobacter</i> spp	5 (83%)	1	6
<i>A. baumannii</i>	1 (33%)	2	3
Ostali	1 (50%)	1	2
UKUPNO	50 (77%)	15	65

Tablica 7. Prevalencija ESBL bolničkih izolata.

Vrsta bakterije	ESBL +	ESBL -	Ukupno
<i>K. pneumoniae</i>	26 (96%)	1	27
<i>E. coli</i>	8 (100%)	0	8
<i>Enterobacter</i> spp	3 (100%)	0	3
<i>M. morgani</i>	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	6 (86%)	1	7
<i>Citrobacter</i> spp	3 (50%)	3	6
<i>A. baumannii</i>	0	0	0
Ostali	4 (80%)	1	5
UKUPNO	50 (89%)	6	56

4.2. Osjetljivost na antibiotike detektirana dilucijskom metodom

Prikupljeni sojevi testirani su na 16 antibiotika metodom disk-difuzije i metodom bujonske mikrodilucije.

Rezistencija na bolničke izolate iznosila je preko 85% na cefalosporine 3. generacije, 78% na gentamicin, te su sojevi bili osjetljivi samo na imipenem, meropenem i tazobaktam. Za izvanbolničke izolate slične su vrijednost, što se može vidjeti iz kumulativne Tablice 8.

Tablica 8. Kumulativna tablica rezistencije metodom mjerenja vrijednosti MIK-ova (ceftazidim (CAZ), ceftriakson (CRO), cefotaksim (CTX), cefoksitin (FOX), tazobaktam (TZB), cefepim (FEP), gentamicin (GEN), imipenem (IMI), meropenem (MEM), ciprofloksacim (CIP), piperacilin (PIP), cefuroksim (CXM)).

Vrsta uzorka	Broj uzoraka		CAZ >32	CRO >64	CTX >64	FOX >32	TZB >128	FEP >32	GEN >8	IMI >16	MEM >16	CIP >4	PIP >128	CXM >32
Izvanbolnički	65	Broj rezist.	46	48	37	53	6	21	42	10	11	33	46	61
		% Rezist.	71.8	75.0	57.8	82.8	9.3	32.8	65.6	15.6	17.2	51.5	71.8	96.8
Bolnički	56	Broj rezist.	45	47	47	50	7	37	43	2	2	36	50	53
		% Rezist.	81.8	85.4	85.4	90.9	12.7	67.2	78.1	3.6	3.6	65.4	90.9	96.3

4.3. Detekcija AmpC beta-laktamaza metodom kombiniranih diskova

Pomoću testa s boroničnom kiselinom istražuju se sojevi koji izražavaju hiperprodukciju kromosomske AmpC beta-laktamaze ili produkciju plazmidnih AmpC beta-laktamaza. Boronična kiselina je inhibitor kromosomske AmpC beta-laktamaze koju proizvode dereprimirani mutanti ili plazmidne AmpC beta-laktamaze. Povećanje inhibicijske zone za najmanje 5 mm u prisustvu boronične kiseline u odnosu na kontrolnu ploču (bez boronične kiseline) očitava se kao pozitivan rezultat hiperprodukcije kromosomske AmpC beta-laktamaze, a time i prisutnost dereprimiranog soja.

Rezultati su vidljivi iz Tablice 4 i 5 (test sa boroničnom kiselinom), te Tablice 9, hiperprodukcija kromosomske AmpC beta-laktamaze zabilježena je u 31 od 65 izvanbolničkih uzoraka urina, što je 48% od ukupnih izolata, pri čemu je produkcija kod *Citrobacteria* bila 85%, kod *Klebsielle* 45%, te kod *E.coli* 38%, dok se kod bolničkih uzoraka proizvodnja AmpC beta-laktamaze zabilježena u 28 od 56 uzorka, što je 50% izolata, pri čemu je najveća produkcija bila kod *Proteusa* i to 86%, *Citrobacteria* 67%, *E. coli* 50%, te *Klebsielle* 33%.

Tablica 9. Produkcija AmpC beta-laktamaze.

Vrsta bakterije	AmpC+	Ukupno izvanbolnički	AmpC+	Ukupno bolnički
<i>K. pneumoniae</i>	10 (45%)	22	9 (33%)	27
<i>E. coli</i>	6 (38%)	16	4 (50%)	8
<i>Enterobacter</i> spp	1 (25%)	4	2 (67%)	3
<i>M. morgani</i>	2 (67%)	3	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	2 (100%)	2	0	0
<i>P. mirabilis</i>	3 (43%)	7	6 (86%)	7
<i>Citrobacter</i> spp	5 (83%)	6	4 (67%)	6
<i>A. baumannii</i>	1 (33%)	3	0	0
Ostali	1 (50%)	2	3 (60%)	5
UKUPNO	31 (48%)	65	28 (50%)	56

4.4. Prijenos rezistencije konjugacijom

Na svih 121 izolat ispitan je prijenos rezistencije metodom konjugacije. Prijenos beta-laktamske rezistencije ostvaren je u ukupno 12 uzoraka (18,5%) izvanbolničkih izolata, i 34 (60,1%) bolničkih uzoraka (Tablice 10 i 11).

Tablica 10. Prijenos rezistencije konjugacijom u izvanbolničkih izolata.

Redni broj	Izolat	Frekvencija
2	Kleb	2×10^{-7}
6	Kleb	$1,5 \times 10^{-7}$
20	Enter	1×10^{-3}
21	<i>E. coli</i>	2×10^{-8}
22	Kleb	2×10^{-7}
31	Citro	$1,25 \times 10^{-6}$
35	Kleb	2×10^{-4}
42	Kleb	$0,75 \times 10^{-7}$
45	<i>E. coli</i>	3×10^{-7}
49	<i>E. coli</i>	$0,37 \times 10^{-5}$
54	<i>E. coli</i>	$0,62 \times 10^{-4}$
57	Kleb	1×10^{-6}

**Kratkice bakterija: *E.coli*-*Escherichia coli*, Kleb-*Klebsiella pneumoniae*, Prot-*Proteus mirabilis*, Citro-*Citrobacter* spp., Morga-*Morganella morgani*, Pseud-*Pseudomonas aeruginosa*, Acinet-*Acinetobacter baumannii*

Tablica 11. Prijenos rezistencije konjugacijom u bolničkih izolata.

Broj	Izolat	Frekvencija
1	Kleb	$0,5 \times 10^{-2}$
2	E. coli	6×10^{-1}
3	Kleb	$0,3 \times 10^{-2}$
4	Kleb	1×10^{-3}
5	Kleb	5×10^{-3}
6	Enter	$0,6 \times 10^{-2}$
7	Kleb	$1,5 \times 10^{-4}$
8	Kleb	2×10^{-3}
9	Kleb	$0,75 \times 10^{-2}$
10	Kleb	2×10^{-3}
11	Kleb	$0,28 \times 10^{-2}$
12	E. coli	4×10^{-3}
15	Kleb	$0,6 \times 10^{-2}$
18	Kleb	$0,5 \times 10^{-2}$
19	Kleb	$0,6 \times 10^{-2}$
22	Kleb	3×10^{-3}
23	Citro	$0,37 \times 10^{-2}$
24	Citro	$0,25 \times 10^{-2}$
26	Citro	$0,75 \times 10^{-2}$
27	Citro	1×10^{-2}
29	Enter	$1,25 \times 10^{-2}$
32	E. coli	$0,58 \times 10^{-7}$
33	Kleb	$2,15 \times 10^{-6}$
34	Kleb	$1,15 \times 10^{-6}$
35	Kleb	$2,1 \times 10^{-4}$
36	Citro	$0,5 \times 10^{-4}$
38	Kleb	$4,5 \times 10^{-6}$
39	Prot	0,125
42	Kleb	2×10^{-1}
43	E. coli	10^{-2}
44	Kleb	10^{-2}
45	Kleb	2×10^{-1}
49	Kleb	3×10^{-7}
56	Prot	$0,6 \times 10^{-4}$

**Kratkice bakterija: E.coli-*Escherichia coli*, Kleb-*Klebsiella pneumoniae*, Prot-*Proteus mirabilis*, Citro-*Citrobacter* spp., Morga-*Morganella morgani*, Pseud-*Pseudomonas aeruginosa*, Acinet-*Acinetobacter baumannii*

4.5. Karakterizacija beta-laktamaza PCR-om

Lančanom reakcijom polimerazom ispitana je pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M. U Tablicama 12 i 13 su prikazani rezultati dobiveni PCR-om za pojedine porodice. Veličina produkta dobivena amplifikacijom sa specifičnim primerima za SHV beta-laktamaze iznosila je oko 950 parova baza, sa specifičnim primerima za TEM beta-laktamaze 858 parova baza, a sa specifičnim primerima za CTX-M beta-laktamaze oko 545 parova.

Sekvenciranje *bla*_{TEM} gena je pokazalo da je TEM-1 dominantni tip TEM beta-laktamaza a sekvenciranje *bla*_{CTX-M} gena je identificiralo CTX-M-15 i CTX-M-3 beta-laktamazu kao dominante tipove. Sekvenciranje *bla*_{SHV} gena je utvrdilo prisutnost SHV-1 beta-laktamaze koja je intrinzična kromosomska beta-laktamaza vrste *K. pneumoniae*.

Tablica 12. Pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M u bolničkim uzorcima.

Broj	Izolat	TEM	CTX-M	SHV	Broj	Izolat	TEM	CTX-M	SHV
1	Kleb	+	+	+	30	E.coli	-	+	+
2	E.coli	+	+	-	31	Enter	-	+	+
3	Kleb	+	+	-	32	E.coli	+	+	+
4	Kleb	+	+	-	33	Kleb	+	+	-
5	Kleb	+	+	+	34	Kleb	+	+	+
6	Enter	-	+	+	35	Kleb	+	+	-
7	Kleb	+	+	+	36	Citro	+	+	-
8	Kleb	+	+	+	37	Kleb	-	+	-
9	Kleb	+	+	+	38	Kleb	+	+	-
10	Kleb	+	+	-	39	Prot	-	+	-
11	Kleb	+	+	-	40	E.coli	-	-	+
12	E.coli	+	+	-	41	Kleb	-	+	-
13	*	-	+	-	42	Kleb	+	+	-
14	Kleb	+	+	-	43	E.coli	+	+	-
15	Kleb	+	+	+	44	Kleb	+	+	-
16	Prot	+	+	-	45	Kleb	+	+	-
17	E.coli	-	+	-	46	*	-	+	-
18	Kleb	+	+	-	47	Kleb	-	-	-
19	Kleb	+	+	+	48	Kleb	-	+	-
20	*	+	+	+	49	Kleb	-	+	-
21	*	-	+	+	50	Citro	-	+	-
22	Kleb	+	+	+	51	Prot	-	+	-
23	Citro	+	+	+	52	Prot	-	+	-
24	Citro	-	-	+	53	Prot	-	+	-
25	*	-	-	+	54	Prot	-	+	-
26	Citro	-	+	-	55	E.coli	-	+	-
27	Citro	-	+	+	56	Prot	-	+	-
28	Kleb	+	+	-					
29	Enter	-	+	+					

* uzorci u kojima nisu točno definirani sojevi

**Kratkice bakterija: E.coli-*Escherichia coli*, Kleb-*Klebsiella pneumoniae*, Prot-*Proteus mirabilis*, Citro-*Citrobacter* spp., Morga-*Morganella morganii*, Pseud-*Pseudomonas aeruginosa*, Acinet-*Acinetobacter baumannii*

U izvanbolničkim uzorcima, nađeno je od ukupno 56 uzoraka 29 pozitivnih TEM beta-laktamaza, 21 SHV beta-laktamaza, te 52 CTX-M beta-laktamaze (Tablica 12).

Dok je u bolničkim uzorcima od ukupno 39 testiranih uzoraka nađeno je 18 TEM beta-laktamaza, 16 CTX-M, te 9 SHV beta-laktamaza. Nisu svi uzorci testirani jer nije bilo dovoljno materijala (Tablica 13).

Tablica 13. Pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M u izvanbolničkim uzorcima

Redni broj	Izolat	TEM	CTXM	SHV	Redni broj	Izolat	TEM	CTXM	SHV
1	Acinet	-	-	-	29	Kleb	-	-	-
2	Kleb	+	+	+	30	Enter	+	-	-
3	Enter	-	-	-	31	Citro	-	-	-
4	Kleb	+	+	+	32	Prot	-	+	-
5	E.coli	+	+	-	34	Citro	-	-	-
6	Kleb	+	+	+	35	Kleb	-	+	-
7	E.coli	-	+	-	37	E.coli	+	-	-
11	Kleb	-	+	+	39	Kleb	-	-	-
13	Kleb	+	+	+	40	Citro	-	-	-
16	E.coli	+	-	-	41	Kleb	+	+	-
17	E.coli	+	+	-	42	Kleb	+	-	-
18	Citro	+	+	+	43	E.coli	-	-	-
20	Enter	-	+	-	44	Morga	-	-	-
21	E.coli	-	-	-	45	E.coli	+	-	-
22	Kleb	+	-	-	47	Kleb	-	-	-
23	Kleb	-	-	-	48	Kleb	+	+	+
24	Citro	-	-	-	49	E.coli	+	+	+
26	Kleb	+	-	-	54	E.coli	-	+	-
28	Prot	+	-	-	56	Morga	-	-	-

**Kratkice bakterija: E.coli-*Escherichia coli*, Kleb-*Klebsiella pneumoniae*, Prot-*Proteus mirabilis*, Citro-*Citrobacter* spp., Morga-*Morganella morganii*, Pseud-*Pseudomonas aeruginosa*, Acinet-*Acinetobacter baumannii*

Tablica 14. Pripadnost beta-laktamaza porodicama TEM, SHV i CTX-M.

	TEM +	TEM -	CTX-M +	CTX-M -	SHV +	SHV -	Ukupno
Izvanbolnički uzorci	18	21	16	23	9	30	39
Bolnički uzorci	29	27	52	4	21	35	56
Ukupno	47 (49%)	48 (51%)	68 (72%)	27 (28%)	30 (32%)	65 (68%)	95

5. RASPRAVA

Osim u bolničkih pacijenata ESBL producirajuće bakterije sve se češće opisuju i u izvanbolničkoj populaciji.

Terapijska upotreba cefalosporina širokog spektra kao što su ceftazidim i cefotaksim dovela je u ranim osamdesetim godinama do pojave kliničkih izolata rezistentnih na te antibiotike osobito među izolatima *K. pneumoniae* i *E. coli*. Ta je rezistencija djelomično uzrokovana produkcijom kromosomalnih beta-laktamaza. Ovaj tip rezistencije je intrizičan i kao epidemiošku posljedicu ima širenje dereprimiranih mutanata u bolničkim sredinama.

Rezistencija na cefalosporine treće generacije posredovana plazmidima je prvi put je opisana u Njemačkoj 1983., pa u Francuskoj, Velikoj Britaniji, Belgiji, Čileu, Argentini i drugim zemljama širom svijeta, a prenosiva je između rodova enterobakterija te je odgovorna za epidemije bolničkih infekcija.

Do sada u Bosni i Hercegovini rađeno je svega nekoliko istraživanja vezanih za prevalenciju ESBL i genotipizaciju infekcija vezanih uz ESBL producirajuće vrste. Ne postoje do sada podaci o kliničkoj i molekularnoj epidemiologiji o pacijentima s infekcijama uzrokovanim ESBL producirajućim Gram-negativnim bakterijama.

Naše istraživanje obuhvatilo je izolate iz Kantonalne bolnice u Zenici, u Bosni i Hercegovini, i pokazalo je da je ukupna prevalencija ESBL producirajućih sojeva enterobakterija (od ukupno 121 uzoraka) 83%, od toga bolničkih izolata 89% a izvanbolničkih 77%. To su vrlo visoke stope rezistencije i potrebno je provoditi daljnja istraživanja o potrošnji i korištenju antibiotika. Test s boroničnom kiselinom pokazao je da je otprilike 50% sojeva i bolničkih i izvanbolničkih uzoraka bilo pozitivno na kromosomske AmpC beta-laktamaze.

Sojevi koji produciraju ESBL češće pokazuju multiplu rezistenciju u odnosu na sojeve koji su negativni.

Sojevi su bili otporni na cefalosporine druge generacije i to u postotku višem od 90%. Također su sojevi bili otporni i na cefalosporine treće generacije, u postotku višem od 72%, te na gentamicin, u postotku između 60 i 70%. Kao što je bilo očekivano, svi sojevi su bili osjetljivi na karbapeneme imipenem i meropenem (manje od 15%), te na tazobaktam. Oko 50% sojeva je bilo rezistentno na cefepim koji je predstavnik cefalosporina četvrte generacije,

a to ukazuje na buduća otežana liječenja inficiranih bolesnika i upotrebu kombinacije antibiotika u terapiji kod takvih slučajeva.

PCR-om su dokazane TEM, SHV i CTX-M beta-laktamaze, i to oko 50% izolata je bilo pozitivno na TEM, 32% na SHV, a najviše, čak 72% na CTX-M beta-laktamaze, što je u skladu s rastućim trendom prevalencije CTX-M beta-laktamaza u svijetu.

Dominantan tip beta-laktamaza bio je CTX-M-15 i taj tip je proširen po čitavom svijetu (u Švicarskoj, Grčkoj, Poljskoj, Rusiji, Kini, Tajvanu, Argentini, Brazilu...), te je prethodno opisan i u susjednim zemljama kao što su Italija, Slovenija i Austrija. Ta beta-laktamaza uzrokuje visoki stupanj rezistencije na cefotaksim ali također dobro hidrolizira i ceftazidim i to objašnjava visoke MIK-ove ceftazidima kod producenata CTX-M-15 beta-laktamaze. CTX-M beta-laktamaze često u laboratoriju ostaju neprepoznate ako se detekcija vrši samo s diskom ceftazidima pa je zbog toga potrebno koristiti dva diska u detekciji ESBL: ceftazidim koji dobro detektira TEM i SHV ESBL i disk cefotaksima koji detektira CTX-M beta-laktamaze.

Izuzetno je važna pravilna detekcija ESBL u laboratoriju radi odabira terapije jer se kod ESBL producenata od beta-laktama u terapiji preporučuju samo karbapenemi s obzirom da su zabilježeni terapijski neuspjesi ako se primjenjuju cefalosporini čak i onda kad rezultati in vitro testiranja pokazuju osjetljivost. Izuzetak su infekcije urinarnog trakta kod kojih se mogu primjenjivati beta-laktami u kombinaciji s inhibitorima beta-laktamaza kao što su amoksicilin/klavulanska ili piperacilin/tazobaktam jer postižu vrlo visoke koncentracije u mokraći.

Značenje beta-laktamaza proširenog spektra je u njihovoj sposobnosti da hidroliziraju veliki broj antibiotika, u broju različitih bakterija koje ih posjeduju, te u njihovoj velikoj geografskoj rasprostranjenosti. Visok postotak Gram-negativnih ESBL producirajućih bakterija nameće potrebu daljnjeg praćenja rezistencije u cilju izbora najefikasnijeg terapijskog sredstva, jer su mogućnosti za terapijski izbor znatno smanjene. Uglavnom su ispitivani sojevi pokazivali osjetljivost samo na karbapeneme, dok su neki osjetljivi i na piperacilin/tazobaktam. S obzirom da se infekcije pojavljuju uglavnom kod starije populacije, često poslje operativnih zahvata, davanje ovih antibiotika samo u hospitalnim uvjetima, često pacijente ostavlja bez adekvatne terapije i onemogućava im zadovoljavajuću kvalitetu života.

Rezistencija uzrokovana beta-laktamazama proširenog spektra veliki je javnozdravstveni problem u mnogim zemljama svijeta. Prevalencija pojedinih tipova ESBL-a u određenoj zemlji odražava odabir primjene antibiotika. Sve veći broj bakterijskih vrsta stječe rezistenciju na veliki broj beta-laktamskih antibiotika što je uzrokom da su terapijske mogućnosti liječenja takvih infekcija sve manje. Nedjelotvorna terapija povećava mortalitet, produžuje boravak u bolnici i potiče bolničko širenje rezistentnih sojeva.

Otkrivanje višestruko otpornih bakterija jedan je od osnovnih zadataka mikrobioloških laboratorija, jer one imaju širok spektar hidrolitičke aktivnosti, sposobnost širenja putem gena ili plazmida na druge ili iste vrste bakterija i multiplu rezistenciju, s ciljem uspješnog liječenja svih pacijenata.

S obzirom da je naše istraživanje jedno od rijetkih u ovom području na uzorcima iz Bosne i Hercegovine, trebalo bi nastaviti kontinuirano pratiti prevalenciju ESBL bakterija u bolnicama i izvanbolničkim izolatima, te njihovu rezistenciju na pojedine antibiotike. Dalje bi se trebalo sekvencirati PCR amplikone i odrediti alelske varijante CTX-M beta-laktamaza, te zaključiti o podrijetlu pojedinih sojeva, te pratiti na koji način se šire (s obzirom na dio svijeta od kuda potječu, da li su tipične za ova područja, te da li se šire unutar bolnica).

6. ZAKLJUČAK

- Prevalencija ESBL sojeva u urinarnim izolatima skupljenih u Kantonalnoj bolnici Zenica, u Bosni i Hercegovini, u periodu od prosinca 2009. do srpnja 2010. godine iznosi 77% za izvanbolničke izolate, te 89% za bolničke, što predstavlja visoku prevalenciju s obzirom na prethodna istraživanja.
- Metodom disk difuzije i bujonske dilucije ustanovljena je rezistencija na cefalosporine 2. i 3. generacije, te čak i na cefalosporine 4. generacije, što ukazuje na porast rezistencije među Gram-negativnim bakterijama na cefalosporine.
- Sojevi su također bili rezistentni i na aminoglikozide (gentamicin).
- Osjetljivost je jedino zabilježena na antibiotike imipenem, meropenem, te kombinaciju piperacilin/tazobaktam.
- Metodom kombiniranih diskova s boroničnom kiselinom ustanovljeno je da je 31 od 65 izvanbolničkih sojeva, tj. 48%, te 28 od 56 bolničkih sojeva, tj. 50% bili pozitivni na produkciju kromosomske ili plazmidne AmpC beta-laktamaze.
- Molekularnim metodama utvrđena je visoka prevalencija CTX-M beta-laktamaza (72%) što je u skladu s drugim studijama.

7. LITERATURA

Andrašević, S., Tambić-Andrašević, A. (2006): Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus* **15**: 245-250.

Andrašević, S., Vranić-Ladavac, M., Tambić-Andrašević, A. (2009): Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik* **4**: 171-176.

Andrašević, S., Vranić-Ladavac, M., Tambić-Andrašević, A. (2009): Uzročnici infekcija mokraćnog sustava i njihova osjetljivost na antibiotike. *Infektološki glasnik* **4**: 165-171.

Apfalter P., Assadian O., Daxbock F., Hirschl A. M., Rotter M. L., Makristathis A. (2007): Extended double disc synergy testing reveals a low prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter* spp. in Vienna, Austria. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **59**: 854-859.

Arlet G., Brami G., Decre D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange PH, Philippon A. (1995): Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM beta-lactamases. *FEMS Microbiology Letters* **134**: 203-208.

Bedenić B. (2009): Antibakterijski lijekovi. U: Uzunović-Kamberović S. (ur.) *Medicinska mikrobiologija*. Štamparija Fojnica, d.o.o., Zenica. str. 221-251.

Bedenić, B. (2004): beta-laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji. *Liječnički Vjesnik* **126**: 314-324.

Bradford, P. A. (2001): Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **48**: 933-951.

Bulat, M., Geber, J., Lacković, Z. (2001): *Medicinska farmakologija*. Medicinska naklada, Zagreb, str: 405-463.

Bush, K. (2001): New beta-Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. *Antimicrobial resistance* **32**: 1085-1088.

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**: 1211-1233.

- Damani, N. N. (2004): Priručnik o postupcima kontrole infekcija. Merkur A.B.D., Zagreb
- Graham, L. P. (1995): An Introduction to Medicinal Chemistry. Department of Chemistry, Paisley University, Oxford University Press. Oxford.
- Hawkey, P. M. (2008): The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**: 11-19.
- Helfand, M. S., Bonomo, A. (2003): beta-Lactamases: A Survey of Protein Diversity. *Current Drug Targets – Infectious Disorders* **3**: 9-23.
- Jacoby G.A. (2009): AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**:161-182.
- Jacoby, G. A, Munoz-Price, L. S. (2005): The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine* **352**: 380-91.
- Kalenić, S., Mlinarić-Missoni, E. (1995): Medicinska bakteriologija i mikologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, str: 210-237.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2011): Temeljna i klinička farmakologija. Medicinska naklada, Zagreb, str: 773-815.
- Kenneth S, Thomson KS. (2010): Extended spectrum beta-lactamase, AmpC and carbapenemase issues. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **48**: 1019-1025.
- Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, Bonomo RA, Paterson DL. (2004): Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131 in South Afrika. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4263-4270.
- Kučišek-Tepeš, N. (1994): Specijalna bakteriologija i odabrana poglavlja iz opće i specijalne mikologije, Školska knjiga, Zagreb, str: 63-90.
- Laurence, D. R., Bennett, P. N. (1988): Klinička farmakologija. Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb, str: 1-239.
- Livermore, D. M. (1995): beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews* **8**: 557-584.

- Medeiros A. A. (1997): Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* **24**: 19-45.
- Morin, R. B., Gorman, M. (1982): *Chemistry and Biology of beta-Lactam Antibiotics*. Academic Press, Inc., New York
- Munier G. K., Johnson C. L., Snyder J. W., Moland E. S., Hanson N. D., Thomson K. S. (2010): Positive extended spectrum beta-lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC beta-lactamases more often than to ESBL. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 673-674.
- Nüesch-Inderbinen M. T., Hächler H., Kayser F. H. (1996): Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **15**: 398-402.
- Numanović F. (2011): Rezistencija na antibiotike – rastući problem današnjice
- Paterson D. A., Bonomo R.A. (2005): Extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* **18** : 657-86.
- Paterson, D. L., Hujer, K. M. , Hujer, A. M. (2003): Extended-spectrum beta -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type b-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47** (11): 3554–3560.
- Petterson, J. E., Rech, M., Jorgensen, J. H. (1997): Extended-Spectrum beta-Lactamases: Dilemmas in Detection and Therapy. *Antimicrobics and infectious diseases newsletter* **8**: 57-61.
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., Poirel, L. (2005): Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-Lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **56**: 52-59.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2006): *Farmakologija*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str: 620-654.
- Samaha-Kfoury J. N., Araj G. F. 2003. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*. 327:1209-13.

Sušić, E. (2004): Mehanizmi rezistencije Enterobakterija prema beta-laktamskim antibioticima. *Acta Medica Croatica* **4**: 307-311.

Šalković-Petrišić, M., Bradamante V. (2010): Penicilini. *Medicinar*

Tambić-Andrašević, A. (2004): Prevelika uporaba antibiotika – bakterije uzvraćaju udarac. *Acta Medica Croatica* **4**: 245-249.

Taneja N, Sharma M. (2008): ESBLs detection in clinical microbiology: why & how?. *Indian Journal of Medical Research* **217**: 297-300.

Tonkić, M: Molekularna karakterizacija sojeva *Escherichia coli* koji luče beta-laktamaze proširenog spektra izoliranih u dječjoj i odrasloj populaciji. Doktorski rad, Split

Watts J. L., Shyrock T. R., Apley M., Bade D. J., Brown S.D., Gray J.T., Heine H., Hunter R. P., Mevius D. J., Papich M. G., Silley P., Zurenko G. E. (2007): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. **28**: 1-56.

Weisglass, H. (1994): *Medicinska bakteriologija*. Medicinska naklada, Zagreb, str: 115-147.

Woodford N., Fagan E. J., Ellington M. J. (2005): Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **10**: 154-155.

Woodford N., Ellington M. J., Coelho J. (2006): Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**: 351-353.

Yen Tan, T., Yong Ng, L. S., He, J., Koh, T. H., Yang Hsu, L. (2009): Evaluation of Screening Methods to Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**: 146-149.

http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50220 (25.02.2014.)

<http://www.studyblue.com/notes/n/penicillin-/deck/885410> (25.02.2014.)

<http://insilicogenomics.in/clavulanic-acid.asp> (25.02.2014.)

<http://ra.webaddressdirectory.org/functional-groups-penicillin.html> (25.02.2014.)

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v75/full/75130303.html> (25.02.2014.)

8. ŽIVOTOPIS

Sara Sivec

Adresa: Jagodnjak 11 a, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mob: +385 98 66 99 95

E-mail: sara.sivec@gmail.com

Datum rođenja: 29.11.1985.

OBRAZOVANJE

2004 – 2014 **apsolvent molekularne biologije**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, smjer molekularna biologija

2000 – 2004 **Opća gimnazija**

7. gimnazija, Križanićeva 4, Zagreb

RADNO ISKUSTVO

Rujan 2010 – Rujan 2011 **KBC Rebro**, Zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju
Kišpatićeva 12, Zagreb

Laboratorijski rad pod mentorstvom Prof. dr. sc. Branke Bedenić, volontiranje

Rujan 2008 – Lipanj 2010 **Conventus credo d.o.o.**, Kruge 48, Zagreb
asistent congress managera

2006 – 2013 (zimski period) **Žuti mačak d.o.o.**
učitelj skijanja

Razni studentski poslovi preko Studentskog servisa u Zagrebu

JEZICI

Engleski tečno u govoru i pismu

Njemački pasivno u govoru i pismu

Francuski početni stupanj

KOMPJUTORSKE VJEŠTINE

Napredno znanje rada na računalu (MS Office, pretraživanje interneta...)

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorije

ZNANSTVENI RAD

Preliminary results of the multicentre study on carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii* in northern Croatia

B. Bedenic, M. Vranic-Ladavac, A. Budimir, V. Rezo-Vranes, S. Sivec, D. Sijak, J. Vranes, N. Beader, S. Kalenic, Z. Bosnjak (Zagreb, Pula, HR),

Predstavljen na European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, u Milanu 2011