

Rezistentne enterobakterije u Hrvatskoj – uloga praćenja rezistencije na antibiotike na nacionalnoj razini

Arjana TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ, prof. dr. sc., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Marko JELIĆ, dipl. ing. biologije

Marija GUŽVINEC, dr. sc.,

dipl. ing. biologije

Iva BUTIĆ, dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Suzana BUKOVSKI, doc. dr. sc., dr. med.,

specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb
Zavod za kliničku mikrobiologiju

Ključne riječi

enterobakterije
mehanizmi rezistencije
β-laktamaze
nacionalno praćenje

Key words

enterobacteriaceae
resistance mechanisms
β-lactamases
national surveillance

Primljeno: 2012–04–25

Received: 2012–04–25

Prihvaćeno: 2012–06–27

Accepted: 2012–06–27

Stručni rad

Rezistencija enterobakterija na antibiotike već dugo ugrožava uspjeh empirijske antimikrobne terapije, no posebno zabrinjava pojava izolata rezistentnih na sve raspoložive antibiotike. U Hrvatskoj se rezistencija na antibiotike sustavno prati kroz rad Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske i Referentnog centra Ministarstva zdravlja za praćenje rezistencije (RC) pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" i dio je nacionalnog programa kojeg provodi Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA). U sklopu nacionalnog praćenja RC prikuplja izolate enterobakterija rijetkog fenotipa iz cijele Hrvatske, što je omogućilo uočavanje prvih sojeva s novim mehanizmima rezistencije: prvi izolati s plazmidnim AmpC β-laktamazama opisani su 2003. g., s NDM enzimom 2009. g., a izolati s KPC β-laktamazama 2011. g. Niti jedan od ovih enzima se još nije značajno proširio Hrvatskom. Pravodobno otkrivanje sojeva s novim mehanizmom rezistencije, pogotovo onih koji pokazuju i veliki epidemijski potencijal, poput ST 258 *Klebsiella pneumoniae*, preduvjet je za uspješno kontroliranje širenja rezistencije.

Resistant enterobacteria in Croatia – the role of national antibiotic resistance surveillance

Professional paper

Antibiotic resistance in enterobacteriaceae has for a long time greatly compromised empirical antibiotic therapy but of greatest concern is the emergence of isolates resistant to all available antibiotics. The Committee for Antibiotic Resistance Surveillance of the Croatian Academy of Medical Sciences and the Ministry of Health Reference Center for Antibiotic Resistance Surveillance (RC) at the University Hospital for Infectious Diseases jointly conduct national resistance surveillance as a part of the national strategy coordinated by the Interdisciplinary Section for Antimicrobial Resistance Control (ISKRA). RC collects isolates with rare phenotypes from all over Croatia which enables detection of strains with novel resistance mechanisms: the first plasmid mediated AmpC β-lactamases were described in 2003, the first NDM enzyme in 2009 and the first KPC β-lactamase in 2011. None of these enzymes spread throughout Croatia as yet. Timely recognition of emergence of the new resistant strains, particularly the ones with an epidemic potential like the ST 258 *Klebsiella pneumoniae*, is a paramount in antibiotic resistance control.

Uvod

Suvremena klinička praksa nezamisliva je bez upotrebe antibiotika u liječenju bakterijskih infekcija. Zbog niske toksičnosti, a visoke baktericidnosti i širokog spektra djelovanja, β-laktamski antibiotici su najčešće korišteni antibiotici u liječenju bakterijskih infekcija [1]. Porast rezistencije na antibiotike, poglavito na β-laktamske antibiotike, postaje sve veći problem na globalnoj razini. Infekcije rezistentnim sojevima rezultiraju pove-

ćanim morbiditetom, smrtnošću i povećanim troškovima liječenja [2]. Posljednja dva desetljeća 20. stoljeća pozornost medicinske struke i farmaceutske industrije bila je usmjerena na problem širenja rezistentnih gram-pozitivnih bakterija, prvenstveno meticilin rezistentnih stafilokoka i vankomicin rezistentnih enterokoka [3]. Početkom 21. stoljeća pažnja se vraća na gram-negativne bakterije, a sve veću zabrinutost izaziva pojava multiplo rezistentnih enterobakterija. Enterobakterije su najučestaliji uzročnici bolničkih i izvanbolničkih infekcija u

pacijenata svih uzrasta [4]. Rezistencija na antibiotike među gram-negativnim bakterijama poznata je još od otkrića penicilinaza u *Escherichia coli* tijekom 1940-ih godina. Od tada su se kontinuirano javljali novi mehanizmi rezistencije koji su ugrožavali uspjeh empirijske terapije, ali su još uvijek ostavljali mogućnost izbora alternativne terapije. Nedavno su, međutim, opisani izolati *Klebsiella pneumoniae* rezistentni na sve raspoložive antibiotike, tzv. "pan drug resistant" (PDR) sojevi [5]. Enterobakterije rezistentne na karbapeneme, antibiotike koji predstavljaju zadnju liniju u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama, opisane su već u mnogim dijelovima svijeta [6].

Praćenje rezistencije bakterija na antibiotike na nacionalnoj razini

U Hrvatskoj se rezistencija bakterija na antibiotike sustavno prati od 1996. g., kada je pri Kolegiju za javno zdravstvo Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) osnovan Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u RH. Od samih početaka rada Odbora bilo je vidljivo da je radi prikupljanja pouzdanih podataka neophodno provesti međulaboratorijsku standardizaciju pri testiranju osjetljivosti na antibiotike. Osnutkom Referentnog centra za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravlja 2003. g. pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. F. Mihaljević" stvoreni su daljnji preduvjeti za unaprjeđenje kvalitete prikupljenih podataka. Uz redovite proljetne i jesenske sastanke Odbora, stručne sastanke i redovite godišnje publikacije stvorila se mreža hrvatskih mikrobioloških laboratorija čiji su voditelji pokazali visoku motiviranost za sudjelovanje u nacionalnom praćenju rezistencije na antibiotike, a pouzdanost podataka je dosegla visoku razinu. Od 2008. g. Odbor i Referentni centar su institucije zadužene za kontinuirano praćenje otpornosti bakterija na antibiotike u okviru aktivnosti predviđenih Nacionalnim programom za kontrolu otpornosti bakterija na antibiotike. Nacionalni podaci o rezistenciji na antibiotike postali su, tako, integralni dio edukacije, javnih kampanja i ostalih nacionalnih aktivnosti usmjerenih na kontrolu rezistencije na antibiotike koje koordinira Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA), interdisciplinarno tijelo (engl. "intersectorial coordination mechanism", ICM) osnovano 2006. g. pri Ministarstvu zdravlja RH.

U sklopu nacionalnog programa praćenja rezistencije na antibiotike prikupljaju se podaci o otpornosti velikog broja klinički značajnih bakterijskih vrsta, a izolati koji se analiziraju dolaze iz svih kliničkih materijala. Dodatno, za invazivne izolate najznačajnijih bakterijskih vrsta prikupljaju se i obrađuju i osnovni klinički i demografski podaci, što je započeto u sklopu *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) projekta, a nas-

tavljeno i nakon prelaska tog projekta u EARS-Net Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. "European Center for Disease Prevention and Control", ECDC).

Od početka rada Odbora dogovoreno je da se izolati neuobičajenog ili rijetkog fenotipa šalju u Referentni centar, a kod enterobakterija rijetki fenotip podrazumijeva izolate svih enterobakterija rezistentne na karbapeneme te izolate *E. coli* i *K. pneumoniae* koji ne proizvode β -laktamaze proširenog spektra (engl. "extended spectrum β -lactamases", ESBL), a rezistentni su na jedan od cefalosporina III ili IV generacije. Na taj način bili smo u mogućnosti uočiti prve sojeve enterobakterija s novim mehanizmima rezistencije i na vrijeme upozoriti hrvatsku medicinsku javnost na pravodobno poduzimanje mjera prevencije širenja multiplo rezistentnih sojeva.

Rezistencija enterobakterija na cefalosporine treće generacije

Cefalosporini proširenog spektra, poznatiji kao cefalosporini treće generacije pojavili su se na tržištu 1980-ih godina kao antibiotici iznimne učinkovitosti u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama. U početku, većina je enterobakterija bila osjetljiva na ove antibiotike, no rezistencija se ubrzo javlja u enterobakterija koje prirodno luče male količine kromosomske AmpC β -laktamaze (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii* i *Serratia* spp.). U divljih izolata ovih vrsta proizvodnja AmpC β -laktamaza je inducibilna, no u mutiranih jedinki hiperprodukcija ovih enzima postaje konstitutivna osobina. U sljedećoj fazi širenja rezistencije geni za AmpC β -laktamaze prelaze na plazmide i na taj se način šire u bakterijske vrste koje prirodno ne posjeduju kromosomske AmpC, poput *E. coli* i *K. pneumoniae* [2]. AmpC enzimi spadaju u Amblerovu molekularnu klasu C β -laktamaza te uz cefalosporine treće generacije hidroliziraju i cefamicine i nisu podložne inhibiciji većinom inhibitora β -laktamaza [7].

Ostale enterobakterije, poglavito *E. coli* i *K. pneumoniae*, rezistenciju na cefalosporine treće generacije najčešće ispoljavaju pomoću β -laktamaza proširenog spektra djelovanja (engl. "Extended spectrum β -lactamase", ESBL) [8]. ESBL hidroliziraju cefalosporine širokog i proširenog spektra djelovanja, monobaktame i peniciline [9]. Ovi enzimi su prvi put otkriveni u Europi sredinom 1980-ih godina i brzo je uočeno da se radi o mutiranim oblicima plazmidnih TEM (TEM-1 i TEM-2) i SHV (SHV-1) β -laktamaza, enzima koji su se proširili među *E. coli* i ostalim enterobakterijama 1960-ih i 1970-ih godina i koji su uvjetovali rezistenciju samo na peniciline i cefalosporine prve generacije [7, 8]. Iako cefalosporini treće generacije nisu substrat za hidrolizu izvornim TEM i SHV penicilinazama, do sada je detektirano više od 200

mutiranih formi ovih enzima koje zbog promjenjenog aktivnog mjesta mogu hidrolizirati cefalosporine treće generacije. ESBL forme TEM i SHV enzima uvelike dominiraju 1980-ih i 1990-ih godina, a rezistencija uzima maha širenjem plazmida među sojevima *K. pneumoniae* [8]. Sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode ESBL uglavnom uzrokuju bolničke infekcije, poglavito na odjelima intenzivne skrbi.

Velika promjena u distribuciji ESBL sojeva javlja se početkom 2000-ih godina ubrzanim širenjem CTX-M enzima iz Argentine. Za razliku od TEM i SHV ESBL enzima, CTX-M nije mutirana verzija već poznatih β -laktamaza širokog spektra, već svoje porijeklo vuče iz kromosomskih gena bakterija roda *Kluyvera* spp., bakterija zanemarive kliničke važnosti [10, 11]. Plazmidi s ovim β -laktamazama se uspješno šire u izvanbolničke sojeve *E. coli* i bolničke sojeve *K. pneumoniae*. Prijelaz ovih kromosomskih β -laktamaza na plazmide se opetovano događao rezultirajući formiranjem 5 različitih skupina CTX-M enzima (skupine: 1, 2, 8, 9, 25) [8]. Različite varijante CTX-M enzima su različito geografski zastupljene. CTX-M-15 (skupina 1) uglavnom je rasprostranjena u Europi, Sjevernoj Americi, Bliskom Istoku i Indiji. CTX-M-14 (skupina 9) je uobičajena za područje Kine, Španjolske i Jugoistočne Azije, dok je CTX-M-2 rasprostranjena uglavnom u Argentini, Izraelu i Japanu [8].

Sojevi koji proizvode ESBL su uglavnom multiplo rezistentni i predstavljaju veliki izazov u liječenju bolničkih infekcija, pogotovo kod kritičnih bolesnika. Sklonost sojeva koji proizvode ESBL da konstantno šire spektar rezistencije na sve veći broj klasa antibiotika, uvelike ograničava izbor antibiotika za liječenje [7]. Geni za

ESBL enzime se nalaze na velikim plazmidima na kojima se također nalaze i geni koji kodiraju determinante uključene u rezistenciju na fluorokinolone, aminoglikozide i trimetoprim-sulfametoksazol [7]. Trenutno su karbapenemi antibiotici prvog izbora u liječenju teških infekcija uzrokovanih sojevima koji proizvode ESBL [4].

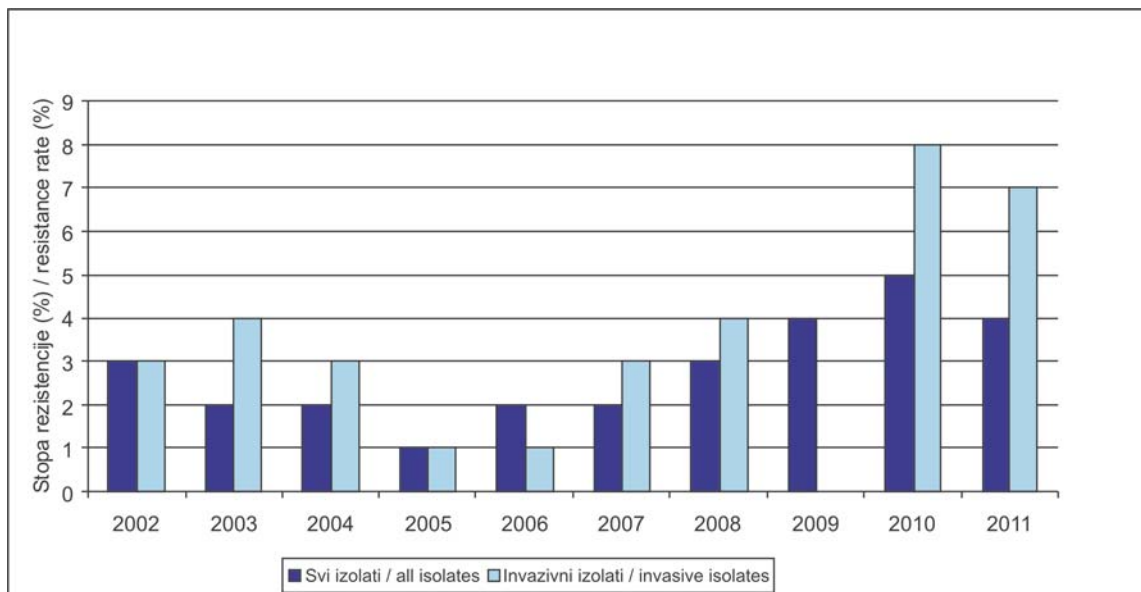
Kretanje rezistencije enterobakterija na cefalosporine treće generacije u Hrvatskoj

Rezistencija na cefalosporine treće generacije u *E. coli* je još uvijek ispod 10 % (slika 1), no u *K. pneumoniae* zadnjih godina prelazi 30 %, a u invazivnih izolata i 50 % (slika 2). U enterobakterija koje imaju kromosomske AmpC β -laktamaze udio derepresiranih mutanti je stabilan i dugi niz godina iznosi oko 20 % (slika 3).

Dok su ESBL sojevi *E. coli* i *K. pneumoniae* bili prisutni u našoj sredini već od samog početka praćenja 1990-tih godina, rezistencija na cefalosporine treće generacije posredovana plazmidnim AmpC β -laktamazama prvi put je u Hrvatskoj opisana 2003.g [12]. Zadnje tri godine uočen je veći broj ovakvih izolata među *E. coli* (slika 4), što još uvijek ne predstavlja značajan udio u velikom ukupnom broju klinički značajnih izolata *E. coli*.

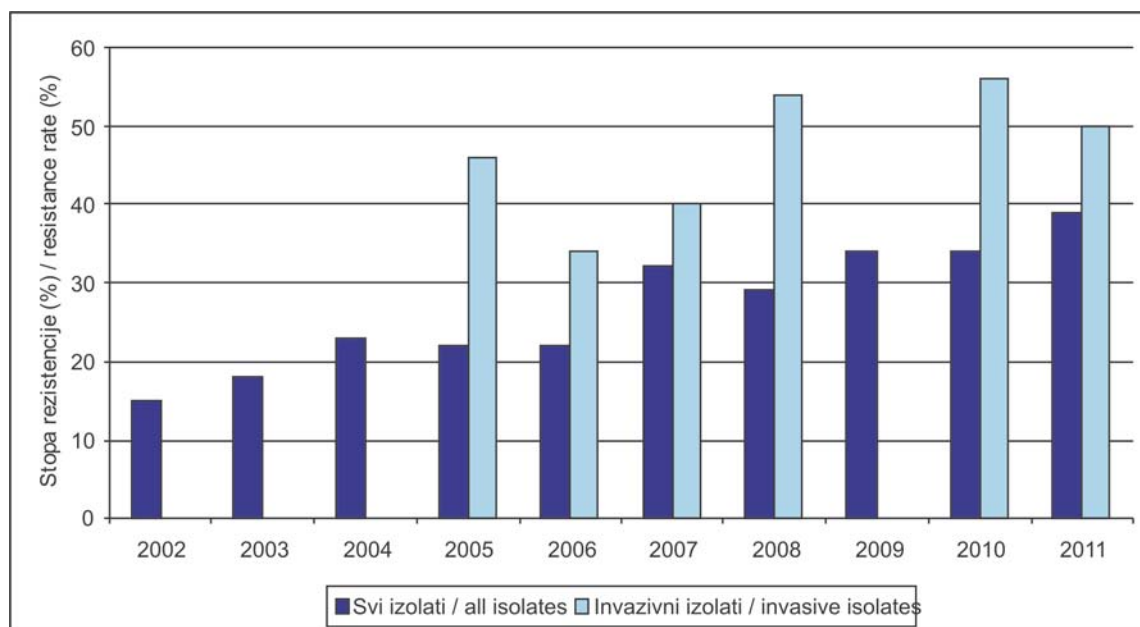
Rezistencija enterobakterija na karbapeneme

Rastuća prevalencija infekcija koje uzrokuju sojevi enterobakterija koji proizvode ESBL dovela je do povećane uporabe karbapenema (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) kao lijekova posljednje linije obrane u li-



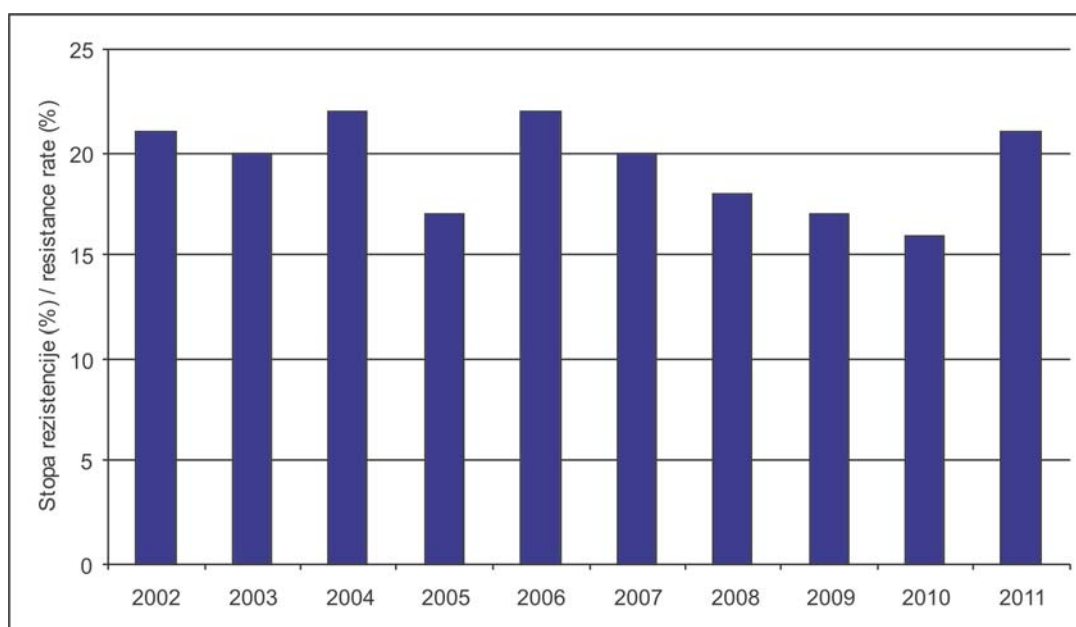
Slika 1. Udio *E. coli* izolata rezistentnih na cefalosporine treće generacije, Hrvatska 2002. – 2011.

Figure 1. Third generation cephalosporin resistance rate in *E. coli* isolates, Croatia 2002 – 2011



Slika 2. Udio *K. pneumoniae* izolata rezistentnih na cefalosporine treće generacije, Hrvatska 2002. – 2011.

Figure 2. Third generation cephalosporin resistance rate in *K. pneumoniae* isolates, Croatia 2002 – 2011

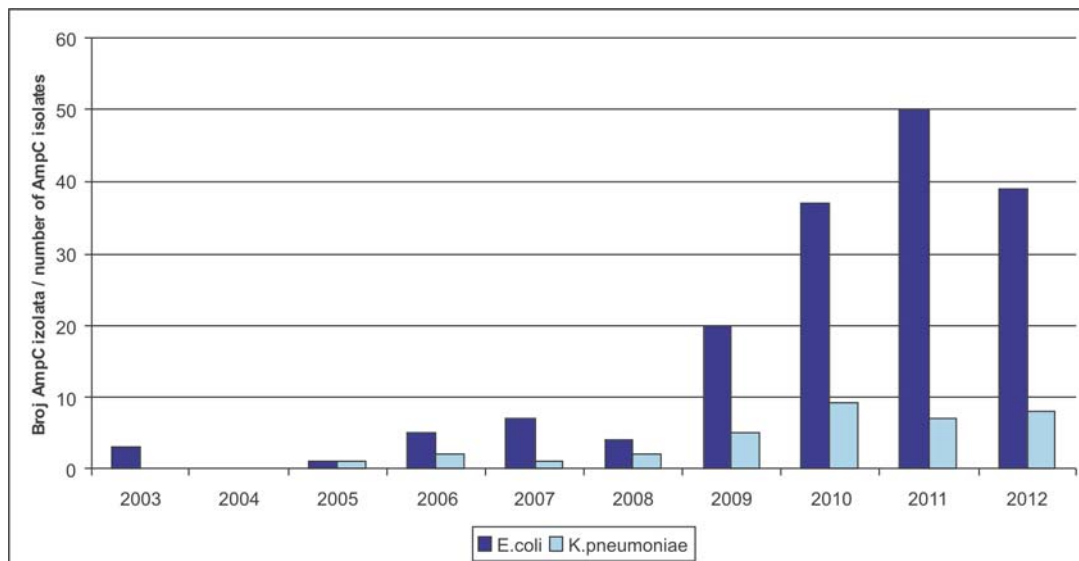


Slika 3. Udio *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. izolata rezistentnih na cefalosporine treće generacije, Hrvatska 2002. – 2011.

Figure 3. Third generation cephalosporin resistance rate in *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. isolates, Croatia 2002 – 2011

ječenju ovih infekcija. Karbapenemi, zbog svoje strukture i veličine, lako ispoljavaju svoja antibakterijska svojstva, dok su u isto vrijeme otporni na hidrolizu većinom β -laktamaza [4, 7]. U pozadini rezistencije enterobakterija na karbapeneme može biti ili produkcija karbapenemaza ili smanjena propusnost bakterijske stjenke koja u kombinaciji s β -laktamazama minimalne sposobnost hidrolize karbapenema (ESBL, AmpC) dovodi do rezistencije [13].

U sojeva koji ne posjeduju gen za karbapenemaze, rezistencija na karbapeneme je uglavnom nestabilna i ima tendenciju spontanog nestanka, zbog negativnog utjecaja smanjene propusnosti stjenke na preživljenje mutanata i zbog nemogućnosti širenja horizontalnim transferom gena [6]. Ovakav mehanizam najčešće dovodi do rezistencije na ertapenem, ali ne i na druge karbapeneme [14]. Za razliku od sojeva koji posjeduju karbapenemaze, smanjena pro-



Slika 4. Broj izolata *E. coli* i *K. pneumoniae* koje proizvode AmpC, Hrvatska 2003. – 2011.

Figure 4. Number of AmpC producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, Croatia 2003 – 2011

pusnost stjenke često dovodi do smanjene osjetljivosti na ostale klase antibiotika [4].

Pojava karbapenemaza u enterobakterija predstavlja veći problem u kliničkoj praksi, zbog velike raznolikosti enzima i činjenice da se rezistencija karbapenemazama može širiti horizontalnim prijenosom gena. Karbapenemaze su enzimi, β -laktamaze, koji hidroliziraju gotovo sve β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme [15]. Geni za karbapenemaze nalaze se često na plazmidima zajedno s genima koji kodiraju determinante rezistencije na ostale klase antibiotika, što značajno smanjuje izbor antibiotika dostupnih za liječenje.

Prisutnost karbapenemaza u enterobakterija poznata je još od sredine 1980-ih godina, čim su karbapenemi ušli u uporabu [4]. Do danas je u enterobakterija identificiran veliki broj karbapenemaza koje pripadaju različitim Amblerovim molekularnim klasama β -laktamaza. Uglavnom se radi o enzimima iz klasa A, B i D, dok AmpC β -laktamaze iz klase C, zbog slabe hidrolitičke aktivnosti, rijetko same uzrokuju rezistenciju na karbapeneme [13]. Klinički i epidemiološki najznačajnija karbapenemaza iz klase A je KPC (engl. "*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*"), dok SME (engl. "*Serratia marcescens enzyme*"), Nmca/IMI (engl. "*not metalloenzyme carbapenemase/imipenem-hydrolysing β -lactamase*") i GES (engl. "*Guiana extended spectrum*") imaju malenu kliničku važnost [4]. Karbapenemaze iz ove klase hidroliziraju širok spektar β -laktama: peniciline, cefalosporine, karbapeneme i aztreonam, no podložne su inhibiciji klavulinskom kiselinom i tazobaktamom [6]. Sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode KPC enzim pojavili su se u SAD-u 1996. godine i ubrzo se proširili diljem cijele države [14]. Izvan SAD-a sojevi su vrlo rašireni u Grčkoj i Izraelu dok se u ostatku Europe KPC sojevi zasada javljaju rijetko [4]. Ipak, sve je veći

broj zemalja u Europi koje prijavljuju naglo širenje KPC sojeva i značajan porast rezistencije *K. pneumoniae* na karbapeneme [15].

Stopa mortaliteta pacijenata s bakterijemijom uzrokovanom sojevima koji proizvode KPC iznosi 70 % [4], a izbor antibiotika za liječenje infekcije ograničen je zbog rezistencije na ostale klase antibiotika. Neki sojevi pokazuju osjetljivost na aminoglikozide, polimiksine (kolistin) i tigeciklin [4]. Iz epidemiološkog aspekta važno je napomenuti da se rezistencija na karbapeneme u ovom slučaju širi uglavnom širenjem specifičnog soja *K. pneumoniae*, koji pripada klonalnom kompleksu CC11, u kojem dominira ST 258. Horizontalni prijenos širenjem plazmida koji posjeduju gene za KPC dešava se rijede, no KPC enzimi su detektirani i u ostalih vrsta porodice *Enterobacteriaceae* (*K. oxytoca*, *Enterobacter* spp. i *E. coli*) [4].

β -laktamaze iz klase B, tj. metalo- β -laktamaze (MBL), hidroliziraju sve peniciline, cefalosporine i karbapeneme, ne inhibiraju ih komercijalno dostupni inhibitori, ali ne hidroliziraju monobaktam aztreonam [6]. Klinički i epidemiološki najznačajniji enzimi koji spadaju u skupinu metalo- β -laktamaza su: VIM (engl. "*Verona integron encoded metallo-beta-lactamase*"), IMP (engl. "*Imipenemase*") i NDM-1 (engl. "*New Delhi metallo- β -lactamase*"). Geni za MBL se nalaze uglavnom na plazmidima koji sadrže i gene koji kodiraju ESBL i AmpC enzime, a izbor terapije je obično sužen na polimiksine i tigeciklin [4]. Enterobakterije koje proizvode VIM su prvi puta detektirane u Grčkoj 2003. g. Do danas su zabilježene dvije varijante enzima (VIM-1 i VIM-2). VIM-2 je endemičan u južnoj Europi (Grčka, Italija, Španjolska) i u istočnoj Aziji (J. Korea i Tajvan) [4, 6]. U Europi su, prvo u Švedskoj sredinom 2008. godine, a potom u većem broju u Velikoj

Britaniji zabilježeni prvi slučajevi infekcija sojevima koji proizvode NDM-1 u pacijenata koji su boravili u Indiji i Pakistanu [16, 17]. NDM enzimi se uglavnom nalaze u *K. pneumoniae*, ali se javljaju i u *E. coli*, *Enterobacter* spp., drugih enterobakterija, pa čak i *Acinetobacter baumannii* [8, 18]. Iako je većina zaraženih ili koloniziranih pacijenata direktno ili indirektno povezana s putovanjima na Indijski potkontinent, primarni rezervoar NDM-1 gena, smatra se da je sekundarni rezervoar NDM-1 gena Bliski istok i Balkan [19, 20]. NDM-1 sojevi istovremeno mogu posjedovati gene za druge karbapenemaze (OXA-48, VIM), AmpC cefalosporinaze, ESBL, 16s rRNAmetilaze, esteraze, gene za enzime koji modificiraju rifampicin i gene koji određuju rezistenciju na sulfametoksazol [13].

OXA-48 (oksalicilaza – 48) je β -laktamaza iz klase D koja ima neobičan spektar hidrolize β -laktamskih antibiotika. Ne hidrolizira ceftazidim, u maloj mjeri hidrolizira cefotaksim, a rezistentna je na inhibiciju klavulinskom kiselinom [5]. Klinički izolati rijetko ispoljavaju fenotip karakterističan za sojeve koji produciraju karbapenemaze, pokazuju nisku razinu rezistencije na karbapeneme i osjetljivost na cefalosporine proširenog spektra i monobaktame te se smatra da je zastupljenost OXA-48 sojeva puno veća od one navedene u literaturi [5]. OXA-48 je prvi puta opisana 2003. godine u *K. pneumoniae* tijekom bolničke epidemije u Turskoj [6]. Osim u *K. pneumoniae*, enzim je otkriven u *E. coli* i do danas su se geni za OXA-48 proširili na zemlje Bliskog istoka, Indiju, Europu i Sjevernu Afriku.

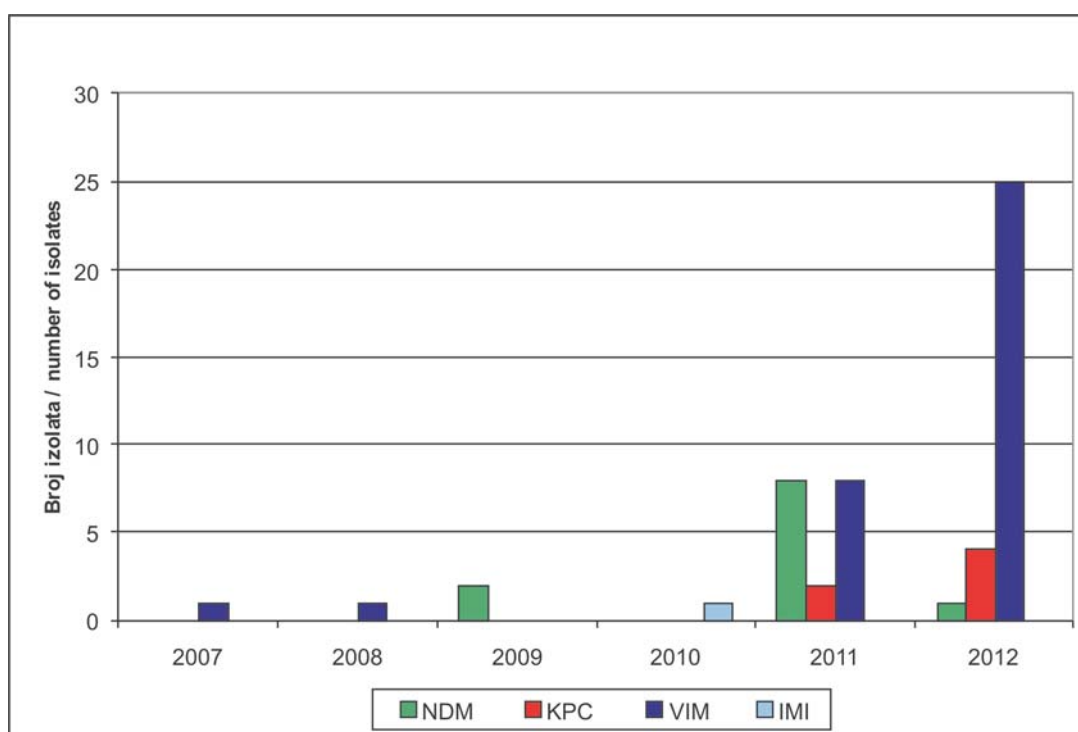
Kretanje rezistencije enterobakterija na karbapeneme u Hrvatskoj

Od početka rada Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike izolati sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme šalju se u Referentni centar za praćenje rezistencije. Dodatno, skupljali su se i izolati smanjene osjetljivosti na cefalosporine koji ne proizvode ESBL, što je povećavalo osjetljivost detekcije slabijih karbapenemaza, tako da vjerojatno ni prije postavljanja oštrijih graničnih koncentracija za karbapeneme 2010. g. nismo propuštali u Hrvatskoj detektirati ove sojeve.

Od početka praćenja u Hrvatskoj su bili prisutni sporadični izolati enterobakterija koji su proizvodili VIM enzime, no tek u posljednje dvije godine se ovi enzimi učestali je pojavljuju (slika 5). Javljaju se u različitim bakterijskim vrstama, različitim gradovima i različitim bolnicama i još uvijek ne pokazuju epidemijski karakter širenja.

Prvi izolat *K. pneumoniae* koji proizvodi NDM-1 izoliran je u Hrvatskoj 2009. g. [21] i do danas je detektirano ukupno 8 izolata (*K. pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *E. coli*) koji su proizvodili NDM-1. Svi slučajevi su bili sporadični, a izolati su pokazivali varijabilnu osjetljivost na imipenem i meropenem te osjetljivost na amikacin, kolistin i tigeciklin.

Prvi izolat KPC *K. pneumoniae* izoliran je u Hrvatskoj 2011. g [22] i do danas je izolirano 15 izolata, uz dokumentirani prijenos s pacijenta na pacijenta. Dok je prvi



Slika 5. Broj izolata enterobakterija koje proizvode karbapenemaze, Hrvatska 2007 – rujan 2012

Figure 5. Number of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolates, Croatia 2007 – September 2012

opisani izolat pripadao ST 37 klonu [22], ostali izolati pripadaju klonu ST 258. S obzirom na dobro poznati epidemijski potencijal ovog klona veliki su naponi uloženi u Hrvatskoj da se spriječi širenje ovog klona pri njegovoj pojavi u zemlji. Pravovremena edukacija na razini mikrobioloških laboratorija i brza komunikacija s Referentnim centrom za praćenje rezistencije omogućila je pravodobno otkrivanje prvih izolata, a zajedničkim djelovanjem dvaju povjerenstava unutar Ministarstva zdravlja RH, ISKRA-e i Povjerenstva za prevenciju i kontrolu infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi, donešeni su specifični naputci za kontrolu širenja ovog soja te u nekoliko navrata upozoravane uprave zdravstvenih ustanova na nužnost provođenja mjera kontaktne izolacije u slučaju pojave ovog soja. Budućnost će pokazati hoćemo li uspjeti u ograničavanju širenja KPC *K. pneumoniae*.

Rezistencija enterobakterija na ostale klase antibiotika

Antibiotici iz klase kinolona uglavnom se koriste u liječenju ozbiljnih infekcija mokraćnog sustava uzrokovanih bakterijama *E. coli*, ali i infekcija uzrokovanih drugim enterobakterijama. Rezistencija na kinolone, stoga, predstavlja ozbiljan klinički problem, a pojava novih mehanizama rezistencije je u žarištu istraživanja [8].

U enterobakterija, rezistencija na kinolone je posljedica promjena u enzimima koji su primarna ciljna mjesta djelovanja antibiotika (DNA giraza i topozomeraza IV) ili smanjenja koncentracije antibiotika u bakterijskoj stanici zbog promjena u propusnosti bakterijske stijenke [23]. Oba mehanizma rezistencije su posljedica mutacija gena koji se nalaze na bakterijskom kromosomu i do nedavnog otkrića plazmidnih determinanti rezistencije na kinolone, smatralo se da su mutacije kromosomskih gena jedini način na koji se rezistencija na kinolone može ispoljiti.

Slučajevi rezistencije na kinolone posredstvom plazmidnih determinanti do sada su zabilježeni u *E. coli* i *K. pneumoniae* [8]. Prva determinanta plazmidne rezistencije na kinolone otkrivena je 1998. godine u SAD kod multiple rezistentnog soja *K. pneumoniae*. Determinanta je nazvana Qnr i kodirana je genom na plazmidu pMG252 [23]. Qnr geni kodiraju proteine s pentapeptidnim ponavljajućim slijedovima koji se vežu za DNA girazu, no točan mehanizam na koji qnr proteini štite DNA girazu još nije otkriven. Svi bakterijski sojevi koji posjeduju qnr gene imaju neznatno povišene vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za nalidiksičnu kiselinu te nešto više za ciprofloksacin i ofloksacin, no sama prisutnost qnr gena u bakterijskoj stanici ne dovodi do klinički značajne rezistencije i vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija ostaju ispod graničnih vrijednosti za kinolone. Prisutnost qnr gena, međutim, smanjuje maksimalnu učinkovitost kinolona pružajući bakterijama pro-

duženi vremenski okvir u kojem dolazi do mutacija i razvoja efikasnijih mehanizama rezistencije na kinolone. Trenutno je poznato 5 skupina qnr gena (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) i svi dijele isti mehanizam djelovanja [23].

Nedugo nakon otkrića qnr gena, otkriveno je još nekoliko determinanti plazmidne rezistencije na kinolone od kojih valja istaknuti enzim AAC(6')-Ib-cr. To je mutirana verzija aminoglikozid acetil transferaze, enzima koji inače modificira i čini neučinkovitim aminoglikozidne antibiotike. Mutacijama u dva kodona ovaj je enzim proširio spektar substrata na kinolone zadržavši svoju aktivnost prema aminoglikozidima [23]. Poput Qnr proteina i AAC(6')-Ib-cr neznatno doprinosi razvoju rezistentnog fenotipa podižući MIK vrijednosti za ciprofloksacin i norfloksacin svega 3-4 puta [23]. Iako nemaju dramatični doprinos rezistenciji na kinolone, pojava plazmidnih determinanti rezistencije na kinolone je zabrinjavajući znak jer su stvoreni uvjeti za brzo širenje kinolonske rezistencije među enterobakterijama, horizontalnim prijenosom gena.

Osim za kinolone, među enterobakterijama pronađene su i nove determinante rezistencije za aminoglikozide. Riječ je o enzimima, zajedničkog imena 16s rRNA metilaze koji uvjetuju visoku, u laboratoriju lako prepoznatljivu, rezistenciju. Sojevi koji posjeduju rRNA metilaze, izrazito su rezistentni na sve trenutno dostupne aminoglikozide. Do sada je, u kliničkim i veterinarskim izolatima, otkriveno šest različitih gena za rRNA metilaze: *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* i *npmA* [24]. Geni ovih enzima se nalaze na plazmidima koji imaju izrazito velik potencijal horizontalnog prijenosa. Horizontalni prijenos je zabilježen čak između fermentora i non fermentora [24]. Svi enzimi metiliraju aminoacilno mjesto na 16s rRNA čime onemogućuju ispoljavanje baktericidnog učinka aminoglikozida [25]. Trenutno je prevalencija sojeva s ovim enzimima vrlo niska, ali s obzirom da se geni za ove enzime mogu lagano horizontalno prenositi, postoji opasnost da ovakvi enzimi postanu veliki problem u budućnosti [25].

Zaključak

Hrvatska se ubraja u zemlje s visokim stopama rezistencije enterobakterija, poglavito *K. pneumoniae*, na cefalosporine treće generacije. Širenje enterobakterija rezistentnih na karbapeneme u Hrvatskoj još nije uzelo maha, no njihova prisutnost se sve češće bilježi. Od posebne je važnosti detektirati svaki izolat *K. pneumoniae* koji proizvodi KPC, s obzirom da su ovi izolati u drugim zemljama pokazali veliki epidemijski potencijal. I u Hrvatskoj su jedino KPC izolati pokazali očit interhumani prijenos, dok su se izolati s drugim karbapenemazama javljali sporadično. Iako za sada sojevi enterobakterija koji proizvode druge karbapenemaze ne pokazuju u Hrvatskoj sklonost

izazivanja epidemija očito je da njihov broj raste i da se geni za proizvodnju karbapenemaza uspješno šire među različitim bakterijskim vrstama. U Hrvatskoj smo, zahvaljujući dobro organiziranoj mreži mikrobioloških laboratorija, u mogućnosti uočavati pojavu sojeva s novim mehanizmima rezistencije te na vrijeme upozoriti na širenje sojeva s većim epidemijskim potencijalom. Neosporno je da kod svakog pacijenta kod kojeg se izolira uzročnik otporan na karbapeneme treba energično primijeniti mjere kontaktne izolacije kako bi se na vrijeme spriječilo širenje ovih sojeva te onemogućio prijelaz plazmida s genima za rezistenciju na karbapeneme u nove epidemiološki uspješnije sojeve.

Literatura

- [1] Thomson, JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005; 8(5): 518–24.
- [2] Hawkey, PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 3–10.
- [3] Nicasio AM, Pharm D, Kuti JL, Nicolau DP. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* 2008; 28(2): 235–49.
- [4] Grundman H, Livermore DM, Giske CG, i sur. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; 15(46): 19711.
- [5] Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008; 13(47): 19045.
- [6] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10): 1791–1798.
- [7] Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006; 119: S20–8.
- [8] Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27(2): 128–142.
- [9] Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 2003; 63: 353–65.
- [10] Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 33–41.
- [11] Livermore DM. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(4): 283–94.
- [12] Giakkoupi P, Tambic-Andrasevic A, Vourli S, i sur. Transferable DHA-1 cephalosporinase in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(1): 77–80.
- [13] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; 18(5): 263–72.
- [14] Skurnik D, Lasocki S, Bremont S i sur. Development of ertapenem resistance in a patient with mediastinitis caused by *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. *J Med Microbiol* 2010; 59: 115–9.
- [15] Canton R, Akova M, Carmeli Y i sur. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5): 413–31.
- [16] Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5046–54.
- [17] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, i sur. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597–602.
- [18] Espinal P, Fugazza G, López Y, i sur. Dissemination of an NDM-2-Producing *Acinetobacter baumannii* Clone in an Israeli Rehabilitation Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(11): 5396–8.
- [19] Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 164.
- [20] Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, i sur. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2): 304–6.
- [21] Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P, i sur. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(3): 532–4.
- [22] Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V, i sur. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 2012; 24(4) 237–9.
- [23] Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 664–689.
- [24] Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Nomenclature of plasmid-mediated 16s rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(6): 2287–2288.
- [25] Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek University Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2011; 18: E52–E54.