

CEFALOSPORINAZE U IZOLATIMA BAKTERIJE *PROTEUS MIRABILIS* IZ DOMOVA ZA STARIJE I NEMOĆNE TE IZVANBOLNIČKIH PACIJENATA

TOMISLAV MEŠTROVIĆ¹, AMARELA LUKIĆ-GRLIĆ^{2,3}, MAJA BOGDAN⁴, DANIELA BANDIĆ-PAVLOVIĆ⁵, GORDANA CAVRIĆ⁶, DOMAGOJ DRENJANČEVIĆ^{7,8}, KATHERINA BERNARDETTE SRETER⁹, ANA BENČIĆ², SANDA SARDELIĆ¹⁰ i BRANKA BEDENIĆ^{2,5}

¹ Poliklinika "Dr. Zora Profozić", Jedinica za kliničku mikrobiologiju i parazitologiju, Zagreb, Hrvatska, ² Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska, ³ Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Hrvatska, ⁴ Služba za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek, Hrvatska, ⁵ Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska, ⁶ Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska, ⁷ Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Osijek, Hrvatska, ⁸ Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska, ⁹ Klinički bolnički centar "Sestre milosrdnice", Zagreb, Hrvatska, ¹⁰ Klinički bolnički centar Split, Split, Hrvatska

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) je sve značajniji uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe. Prethodna istraživanja rezistencije u *P. mirabilis* u Hrvatskoj su pokazala dominaciju TEM-52 beta-laktamaze proširenog-spektra (ESBL) i pojavu plazmidnih AmpC beta-laktamaza. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi evoluciju i dinamiku pojavljivanja cefalosporinaza u *P. mirabilis* u domovima umirovljenika te usporediti izolate iz domova s onima u izvanbolničkoj populaciji. Ukupno je prikupljen 41 izolat rezistentan na cefalosporine treće generacije iz dva doma za starije i nemoćne te od izvanbolničkih pacijenata u razdoblju od ožujka 2015. do rujna 2017. godine. Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je metodom dilucije u bujonu. ESBL i plazmidne AmpC beta-laktamaze su detektirane fenotipskim testovima s inhibitorima te metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Plazmidi su karakterizirani konjugacijom, transformacijom i replikon-tipizacijom. Svi izolati su pokazivali visoki stupanj rezistencije na amoksisilin te na cefalosporine prve, druge i treće generacije. Tri izolata su pokazivala pozitivan test dvostrukog diska i kombiniranih diskova s klavulanskom kiselinom, što je upućivalo na produkciju ESBL. Trideset-osam izolata je bilo negativno fenotipski na ESBL ali su imali pozitivan Hodgeov test i test kombiniranih diskova s fenilboroničnom kiselinom, što je upućivalo na produkciju AmpC beta-laktamaze. PCR-om su dokazane CTX-M i TEM beta-laktamaze u ESBL-pozitivnih izolata i CMY u izolata pozitivnih na AmpC. U CTX-M pozitivnim izolatima identificiran je plazmid iz IncK grupe, dok AmpC-pozitivni sojevi nisu posjedovali plazmid. Ovim istraživanjem dokazali smo perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima ove bakterijske vrste u jednom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu te u izvanbolničkoj populaciji. Kao i u nekim drugim istraživanjima, uočen je trend skretanja beta-laktamaza od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima. Shodno tome, pravilna i brza laboratorijska identifikacija tipa cefalosporinaze postaje sve važniji preduvjet za odabir adekvatne terapije.

Ključne riječi: cefalosporinaze – genetika; cefalosporini – farmakologija; *Proteus mirabilis* – genetika; bakterijska otpornost na lijekove – djelovanje lijeka, genetika; beta-laktamaze – genetika, metabolizam; plazmidi – analiza, genetika; testovi osjetljivosti mikroorganizama; Hrvatska – epidemiologija

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Branka Bedenić, dr. med.
Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb
10 000 Zagreb, Hrvatska
Kišpatićeva 12
E-pošta: branka.bedenic@mef.hr

UVOD

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) je gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija iz obitelji *Enterobacteriaceae* koja je značajan uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe (1). Najčešće uzrokuje infekcije mokraćnog sustava i rana. Značajan terapijski problem jest sve veći postotak višestruko otpornih, tj. multirezistentnih izolata *P. mirabilis* zbog produkcije beta-laktamaza proširenog spektra i AmpC beta-laktamaza, a u novije vrijeme i karbapenemaza (2-4).

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) hidroliziraju cefalosporine treće i četvrte generacije te monobaktame, a osjetljive su na inhibitore kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (3,5-8). TEM i SHV beta-laktamaze proširenog spektra nastaju od parentalnih TEM-1, TEM-21 i SHV-1 beta-laktamaza širokog spektra mutacijama koje mijenjaju konfiguraciju aktivnog središta i šire spektar djelovanja enzima (8). Za razliku od njih, CTX-M beta-laktamaze su nativne ESBL, a nastale su od kromosomskih beta-laktamaza vrste *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana* (9).

Prva CTX-M beta-laktamaza bila je CTX-M-1 opisana još u Njemačkoj 1995. godine („cefotaksimase-Munich“). Prema važećoj klasifikaciji dijele se u pet skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (9, 10). U skupini 1 postoji više alelskih varijanti, a najčešća je CTX-M-15. Za razliku od većine TEM i SHV varijanti bolje hidroliziraju cefotaksim nego ceftazidim. Nadalje, AmpC beta-laktamaze hidroliziraju treću generaciju cefalosporina, monobaktame i cefamicine, ali ne djeluju na cefalosporine četvrte generacije. Za razliku od ESBL nisu osjetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom (11). *P. mirabilis* nema kromosomsku AmpC beta-laktamazu pa je rezistencija na cefoksitin u te vrste obično uzrokovana plazmidnim AmpC beta-laktamazama (12).

U prethodnom multicentričnom istraživanju u Europi utvrđeno je da je produkcija CMY beta-laktamaza najčešći mehanizam rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u *P. mirabilis* (13) s dominacijom CMY-12 i CMY-14 varijante u Poljskoj (14), CMY-16 u Grčkoj i u Italiji (13), CMY-4 u Tunisu (15) i CMY-99 u Bugarskoj (16). Izolati s CMY-16 beta-laktamazom uzrokovali su epidemiju infekcija mokraćnog sustava u domu za starije u Italiji (17). Osim AmpC beta-laktamaza, i ESBL mogu dovesti do rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u izolata *P. mirabilis* (18). Starija istraživanja su pokazala dominaciju TEM-10 i TEM-

52 beta-laktamaze u Europi (19-21). U novije vrijeme zapažen je porast CTX-M varijanti u *P. mirabilis*, kao i u ostalih enterobakterija (12,22,23).

Prethodna istraživanja rezistencije u *P. mirabilis* u Hrvatskoj su pokazala dominaciju TEM-52 beta-laktamaze proširenog-spektra u KBC-u Split (24, 25) i CMY-16 u domu za starije i nemoćne osobe „Godan“ u Zagrebu (26). U susjednoj Bosni i Hercegovini također su opisane CMY-2 i CTX-M-15 (27).

Domovi za starije i nemoćne općenito su značajan rezervoar multirezistentnih enterobakterija. Bolesnici koji borave u domovima često bivaju hospitalizirani i kolonizirani multirezistentnim izolatima za vrijeme boravka u bolnici. Nadalje, sve je veći trend propagacije ESBL i AmpC beta-laktamaza u izvanbolničku sredinu (29). U prethodnom istraživanju provedenom na izolatima iz doma Godan u Zagrebu utvrđena je visoka stopa AmpC beta-laktamaza iz CMY porodice (26). Cilj ovog istraživanja bio je usporediti molekularni profil rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u izolata prikupljenih iz dva doma za starije i nemoćne u Zagrebu s onima u izvanbolničkim izolatima kako bi se utvrdili mehanizmi i putovi širenja.

MATERIJALI I METODE

Bakterijski izolati

U vremenskom razdoblju od ožujka 2015. godine do rujna 2017. godine prikupljen je ukupno 3321 izolat bakterije *P. mirabilis* iz izvanbolničkih uzoraka i iz domova umirovljenika, od čega je 41 izolat (1,23 %) bio rezistentan na cefalosporine treće generacije (ceftazidim, cefotaksim ili ceftriakson). Izolati su skupljeni iz različitih bolesničkih uzoraka, i to iz dva doma za starije i nemoćne osobe te od vanjskih bolesnika čiji su uzorci obrađivani u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Zagreb. Iz prvog doma (na tablici 1 označenog kao dom A) prikupljeno je 25 izolata, iz drugog doma (na tablici 1 označen kao dom B) dva izolata, dok je od vanjskih pacijenata prikupljeno 14 izolata. Pet izolata je potjecalo iz obrisaka rana, jedan iz iskašljaja (sputuma), a svi ostali iz urina. Izolati su identificirani konvencionalnim mikrobiološkim biokemijskim testovima te potvrđeni MALDI-TOF metodom masene spektrometrije (Microflex™aldi Bio-typer MS, Bruker-Daltonik, Fremont, CA, SAD; korišteni softver: MALDI BIOTYPER version 3.1., Build 65).

Tablica 1.

Minimalne inhibitorne koncentracije različitih antimikrobnih lijekova i tipovi beta-laktamaza izolata *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) iz dva doma za starije i nemoćne (1A, 1B) te izvanbolničke populacije (1C)

1A. Dom za starije i nemoćne

Broj o	Godina izolacije	Uzorak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	FOX	CRO	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2015.	Urin	2015042665	≥128	32	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	1	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2015.	Urin	2015046074	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,5	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
3	2015.	Iskašljaj	2015086441	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	2	0,5	1	32	≥128	-	+	CMY, TEM
4	2015.	Urin	2015087514	≥128	32	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,5	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
5	2015.	Urin	2015078518	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
6	2015.	Urin	2015117676	≥128	≥128	32	≥128	≥128	64	16	4	8	16	0,12	0,12	1	64	≥128	+	-	TEM
7	2015.	Urin	2014162797	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
8	2015.	Urin	2015221956	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	0,5	0,12	0,5	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
9	2016.	Urin	2016024787	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	1	1	64	≥128	-	+	CMY
10	2016.	Obrisak rane	51926	≥128	64	16	≥128	≥128	16	≥128	8	≥128	16	1	0,25	0,5	32	0,5	+	-	CTX-M, TEM
11	2016.	Urin iz katetera	110160	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,06	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
12	2016.	Urin	25390	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
13	2016.	Urin	54382	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,06	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
14	2016.	Obrisak rane	161241	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	2	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
15	2016.	Urin	6172449	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,25	2	64	≥128	-	+	CMY, TEM
16	2016.	Urin	6228367	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	64	≥128	-	+	CMY, TEM
17	2017.	Urin	7004595	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	0,25	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
18	2017.	Urin iz katetera	6008079	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	1	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
19	2017.	Obrisak rane	7033979	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
20	2017.	Urin	35792	≥128	32	64	≥128	≥128	≥128	≥128	4	≥128	64	0,5	0,12	1	64	≥128	+	+	CTX-M, TEM
21	2017.	Obrisak rane	64548	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
22	2017.	Urin	66550	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	0,5	0,12	0,5	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
23	2017.	Obrisak rane	74409	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
24	2017.	Urin	2015154570	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
25	2017.	Urin	165729	≥128	≥128	64	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,25	1	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM

1B. Dom za starije i nemoćne osobe

Broj o	Godina izolacije	Uzorak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	FOX	CRO	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2016.	Urin	67410	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	4	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2017.	Urin	76324	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,25	1	1	≥128	-	+	CMY, TEM

1C Vanjski pacijenti

Broj o	Godina izolacije	Uzrak	Broj protokola	AMX	AMC	TZP	CZ	CXM	CAZ	CTX	CRO	FOX	FEP	IMI	MEM	ERT	GM	CIP	ESBL	AmpC	BL
1	2015.	Urin	2015057631	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY, TEM
2	2015.	Urin	2014064696	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,25	0,5	0,5	2	-	+	CMY, TEM
3	2015.	Urin	2015074408	≥128	≥128	4	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	2	≥128	≥128	-	+	CMY
4	2015.	Urin iz katetera	2015080157	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	0,5	2	≥128	-	+	CMY, TEM
5	2015.	Urin	2015110887	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	4	1	0,25	1	4	≥128	-	+	CMY, TEM
6	2016.	Urin	41644	≥128	≥128	64	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	32	2	0,06	4	4	≥128	-	+	CMY, TEM
7	2016.	Urin	47071	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	1	0,06	1	0,5	≥128	-	+	CMY, TEM
8	2016.	Urin	51896	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	0,5	0,12	1	8	≥128	-	+	CMY, TEM
9	2016.	Urin	6103301	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,25	0,5	16	≥128	-	+	CMY, TEM
10	2016.	Urin	55311	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	8	2	0,06	0,5	1	≥128	-	+	CMY, TEM
11	2016.	Urin	6233394	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	2	0,12	0,5	2	≥128	-	+	CMY, TEM
12	2017.	Urin	6013040	≥128	≥128	8	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,5	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
13	2017..	Urin	32252	≥128	≥128	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	32	2	0,12	0,5	32	≥128	-	+	CMY, TEM
14	2017.	Urin	65269	≥128	≥128	32	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	16	1	0,12	0,5	0,25	≥128	-	+	CMY, TEM

Kratice: AMX-amoksilin; TZP-piperacilin/tazobaktam; CXM-cefuroksim; CAZ-ceftazidim; CTX-cefotaksim; CRO-ceftriakson; FEP-cefepim; FOX-cefoksitin; IMI-imipenem; MEM-meropenem; GM-gentamicin; CIP-ciprofloksacin; ESBL-fenotipski test s klavulanskom kiselinom za dokaz beta-laktamaza proširenog spektra, AmpC-fenotipski test s feniloboroničnom kiselinom za dokaz AmpC beta-laktamaza; BL-sadržaj beta-laktamaza

Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove

Testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove rađeno je disk-difuzijskom metodom i bujonskom mikrodilucijskom metodom prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*Clinical & Laboratory Standards Institute*; CLSI) (29). Izolati su testirani disk difuzijskom metodom po Kirby-Baueru na Mueller-Hintonovom (MH) agaru na sljedeće antimikrobne lijekove (BioRad, Francuska): amoksilin (30 mcg), ko-amoksiklav (20/10 mcg), cefuroksim (30 mcg), ceftazidim (30 mcg), cefepim (30 mcg), cefotaksim (30 mcg), ceftriakson (30 mcg), cefoksitin (30 mcg), piperacilin/tazobaktam (100/10 mcg), imipenem (30 mcg), meropenem (30 mcg), gentamicin (10 mcg), amikacin (30 mcg) i ciprofloksacin (30 mcg). Rezultati su interpretirani prema smjernicama CLSI-a (29). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je određivana metodom dilucije u bujonu u mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica te u Mueller-Hintonovom bujonu. Za kontrolu kvalitete korišteni su

kontrolni sojevi *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 i *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 700603 kao standardno preporučeni standardni kontrolni sukladno uputama CLSI-a (29). Sojevi su karakterizirani kao multirezistentni, ekstenzivno rezistentni ili panrezistentni prema kriterijima Magiorakos i suradnika (30).

Fenotipski testovi za detekciju beta-laktamaza

Izolati rezistentni na cefalosporine proširenog spektra podvrgnuti su testiranju na produkciju ESBL. Sumnja na produkciju plazmidnih AmpC beta-laktamaza postavljena je na temelju rezistencije na cefoksitin.

Metoda dvostrukog diska

Prekonoćna kultura testiranog soja je razrijeđena tako da se dosegne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5, što odgovara za 10⁸ CFU/mL. To razrijeđenje je zasijano na Mueller-Hintonov

agar, a zatim su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima. U sredinu ploče je stavljen disk ko-amoksiklava kao izvor klavulanske kiseline na udaljenosti 2-3 cm od perifernih diskova. Ploče su inkubirane 18-24 h na 35-37 °C. Deformacija inhibicijske zone oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama u smjeru prema centralnom disku s klavulanskom kiselinom tumačena je kao pozitivan rezultat koji ukazuje na produkciju ESBL-a (31).

Metoda kombiniranih diskova po CLSI-u za detekciju ESBL i AmpC beta-laktamaza

Prekonoćna kultura testiranog izolata pripremljena je kao i za prethodnu metodu te zasijana na Mueller-Hintonov agar. Na ploču su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama – s dodatkom i bez dodatka klavulanske kiseline za detekciju ESBL te fenilboronične kiseline za detekciju AmpC beta-laktamaze. Klavulanska kiselina je kapana na površinu diska u koncentraciji od 10 000 µg/mL. Ploče su zatim inkubirane 18-24 h na 35-37 °C. Inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu na kontrolnu ploču bez klavulanske kiseline dokazala je produkciju ESBL, a uz fenilboroničnu kiselinu AmpC beta-laktamaze (29, 32).

Hodgeov test

E. coli ATCC 25922 (osjetljivi soj) zasijana je u Mueller-Hintonov bujon i inkubirana preko noći. Prekonoćna kultura je razrjeđivana u fiziološkoj otopini tako da se dobije gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5 te zatim zasijavana na Mueller-Hintonov agar na koji je stavljen disk cefoksitina. Okomito na disk povučena je crta testiranog izolata. Ploče su inkubirane preko noći. Ako je izolat proizvodio AmpC beta-laktamazu, uočeno je uvrtnje inhibicijske zone oko diska cefoksitina u obliku lista djeteline (29).

Prijenos rezistencije metodom konjugacije

Prijenos rezistencije na ceftazidim testiran je metodom konjugacije u bujonu (33). Kao recipijent korišten je soj *E. coli* J62 rezistentan na natrijev azid. Donori i recipijent su inokulirani u srčano-moždani infuzijski bujon, inkubirani 4-6 sati (do kasne eksponencijalne faze) i zatim zasijani u omjeru 1:2 u 5 mL srčano-moždanog infuzijskog bujona. Mješavina donora i recipijenta inkubirana je preko noći te zasijavana na selektivne podloge. Transkonjuganti su selekcionirani na MacConkey agaru koji sadržava cefotaksim (2 mg/L) i/ili natrijev azid (100 mg/L). Testiran je i ko-transfer rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike kao što su aminoglikozidi, tetraciklin, kloramfenikol, sulfonamidi i trimetoprim s obzirom da se geni rezistencije na

te antibiotike često nalaze na istom plazmidu kao i gen koji kodira ESBL. Frekvencija prijenosa je određivana relativno u odnosu na broj stanica donora.

Detekcija gena rezistencije

Geni koji kodiraju beta-laktamaze širokog i proširenog spektra (bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M} i bla_{PER-1}) (34-36), plazmidne AmpC β-laktamaze (37) i rezistenciju na fluorokinolone ($qnrA$, $qnrB$, $qnrS$) određivani su primjenom lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain reaction*; PCR) kao što je prethodno opisano. Skupina CTX-M beta-laktamaza određivana je multiplex PCR-om prema Woodford i suradnicima (38). PCR-mapiranje učinjeno je s početnicama za insercijske sekvence IS26 i *ISEcp1* u kombinaciji s uzvodnom i nizvodnom početnicom (*forward primer* i *reverse primer*) za bla_{CTX-M} ili bla_{CTX-M} gen kako bi se dokazala prisutnost insercijske sekvence ispred ili iza gena. Detekcija PCR produkata učinjena je elektroforezom u agarozu gelu s naknadnim bojenjem etidijevim bromidom. Vizualizacija produkata učinjena je pod ultraljubičastim (UV) transiluminatorom. Amplikoni pojedinih predstavnika pročišćeni su na kolonama *Qiagen Purification Kit* (Qiagen, Njemačka) i zatim sekvencirani u oba smjera u Eurofin servisu (Ebersberg, Njemačka). Sekvence nukleotida i aminokiseline koje proizlaze iz njih analizirane su pomoću Blast programa na stranici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Identifikacija mutacija u bla_{SHV} , bla_{TEM} i bla_{CTX} genima temeljena je na: Bush K, Jacoby GA. *Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β-lactamases*. Lahey Clinic; 2002. Dostupno na <http://www.lahey.org/studies/>.

Karakterizacija plazmida

Plazmidi su ekstrahirani *Qiagen Mini Kitom* (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača te podvrgnuti elektroforezi u agarozu gelu (0,7 %) s naknadnim bojenjem etidijevim bromidom. Veličina vrpce je uspoređivana s vrpčama kontrolnog soja *E. coli* NTCC 50192 koji ima četiri vrpce od 148, 64, 36 i 7 kilobaza. Plazmidi su zatim podvrgnuti multiplex PCR-u za određivanje inkompatibilne skupine prema Carattoli i sur. (39). Plazmidi reprezentativnih sojeva (1, 4 i 7) podvrgnuti su pokusu transformacije. Plazmidna DNA prenešena je na *E. coli* soj J62 koji je prethodno obrađen kalcijevim kloridom (CaCl) da bi mogao primiti plazmid. Transformanti su selekcionirani na podlozi koja je sadržavala 2 mg/L cefotaksima (33).

REZULTATI

Osnovni sociodemografski profil bolesnika

Od ukupno 41 izolata bakterijske vrste *P. mirabilis* rezistentne na cefalosporine treće generacije koji su prikupljeni iz dva doma za starije i nemoćne osobe te od izvanbolničkih pacijenata, 24 izolata pronađeno je kod ženskih pacijenata (58,54 %), a 17 izolata kod muških pacijenata (41,46 %). Raspon godina ženskih pacijenata bio je 71-94 (srednja vrijednost: 84,71; medijan: 84,5), a muških pacijenata 64-96 (srednja vrijednost: 80,12; medijan: 81). Raspon godina svih pacijenata (dakle, i muških i ženskih) od kojih su dobiveni izolati bio je 64-

96 (srednja vrijednost: 82,80; medijan: 83; mod: 94).

Rezultati testiranja osjetljivosti na antimikrobne lijekove i fenotipska detekcija beta-laktamaza

Svi su izolati pokazivali visoki stupanj rezistencije na amoksisilin i cefalosporine prve, druge i treće generacije (tablica 1 i 2). Tri su izolata pokazivala pozitivan test dvostrukog diska i kombiniranih diskova s klavulanskom kiselinom, što je upućivalo na produkciju ESBL. Trideset-osam izolata bilo je negativno fenotipski na ESBL, ali su imali pozitivan Hodgeov test i test kombiniranih diskova s fenilboroničnom kiselinom, što je upućivalo na produkciju AmpC beta-laktamaze.

Tablica 2.

Distribucija minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK-ova) različitih antimikrobnih lijekova za CMY-pozitivne izolate *P. mirabilis*. Sjenčanjem su označene prijelomne točke prema CLSI-u (27); vrijednost MIK-a istoznačna ili veća od prijelomne točke ukazuje na rezistenciju.

ATB	Postotak izolata inhibiranih uz određenu koncentraciju antibiotika												
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
AMX													100%
AMC										5,263%			94,737%
TZP							2,632%	13,158%	26,316%	50%	5,263%		2,632%
CZ													100%
CXM													100%
CAZ													100%
CTX													100%
CRO													100%
FEP							10,526%	28,947%	55,263%	5,263%			
IMI				21,053%	39,474%	39,474%							
MEM	13,158%	34,211%	34,211%	10,526%	7,895%								
ERT				28,947%	52,632%	15,789%	2,632%						
GM			2,632%	5,263%	5,263%	5,263%	7,895%	2,632%	2,632%	10,526%	13,158%		44,737%
CIP						2,632%							97,368%

Tri ESBL-pozitivna izolata su iskazivala rezistenciju na amoksisilin, ko-amoksiklav, cefazolin, cefuroksim i gentamicin, kao i varijabilne MIK-ove ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i cefepima, kao što je vidljivo iz tablice 1. Svi su bili osjetljivi na karbapeneme i piperacilin/tazobaktam. Nadalje, svi AmpC-pozitivni sojevi bili su rezistentni na amoksisilin, ko-amoksiklav, cefazolin, cefuroksim, ceftazidim, cefotaksim i ceftriakson. Visoke stope rezistencije zabilježene su i za ciprofloksacin (97,4 %) i gentamicin (73,7 %) (tablica

2). Svi sojevi bili su osjetljivi na karbapeneme, a samo dva su bila rezistentna na cefepime (5,3 %) te jedan na piperacilin/tazobaktam (2,6 %) (tablica 2). Svi izolati iz mokraće bili su rezistentni na sulfametoksazol/trimetoprim i nitrofurantoin u disk-difuzijskom testu.

Rezultati konjugacije

Ukupno su tri izolata prenijela rezistenciju na ceftazidim na *E. coli* recipijent uz frekvenciju od 10^{-7} do 10^{-5} .

Sva tri su bila fenotipski pozitivni na ESBL. Transkonjuganti su pokazivali smanjenu osjetljivost na cefalosporine treće i četvrte generacije, a također je prenešena i rezistencija na sulfometoksazol/trimetoprim, kloramfenikol i tetraciklin (a u jednog soja također i na gentamicin). AmpC-pozitivni izolati nisu prenijeli rezistenciju na ceftotaksim na recipijent.

Detekcija gena rezistencije

Od tri izolata fenotipski pozitivna na ESBL, dva su producirala CTX-M beta-laktamazu iz skupine 1, a jedan TEM beta-laktamazu. U svih sojeva fenotipski pozitivnih na AmpC je PCR-om identificirana CMY beta-laktamaza i dodatna TEM beta-laktamaza koja je u jednom soju (soj br. 2) identificirana kao TEM-1. Sekvenciranje *bla*_{CTX-M} gena soja br. 1 je identificiralo CTX-M-15 beta-laktamazu, a *bla*_{CMY} gena soja br. 2 CMY-16 alelsku varijantu. *ISEcp* je identificirana ispred *bla*_{CMY} i *bla*_{CTX-M} gena. *Qnr* geni nisu pronađeni.

Karakterizacija plazmida

Dva izolata s CTX-M beta-laktamazom su imala plazmid veličine od 100 do 110 parova baza koji je spadao u IncK grupu, dok svi ostali (CMY pozitivni) nisu imali vrpce na elektroforezi plazmida te su bili negativni na plazmidne inkompatibilne dosada opisane tipove. CMY-pozitivni sojevi koji nisu prenijeli rezistenciju na cefotaksim u pokusu konjugacije također nisu prenijeli plazmid ni u pokusu transformacije. S obzirom da su ESBL pozitivni sojevi proizveli transkonjugante u pokusu konjugacije nije ih bilo potrebno podvrgavati transformaciji.

RASPRAVA

Rezultati našeg istraživanja ukazali su na perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima bakterije *P. mirabilis* u obuhvaćenom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu te u izvanbolničkoj populaciji. CMY cefalosporinaze su u *P. mirabilis* prethodno opisane, osim u domu za starije i nemoćne osobe Godan u Zagrebu, također i u Kliničkom bolničkom centru Split te u izolatima bakterije *E. coli* od kućnih ljubimaca (26,40,41).

U usporedbi s prethodnim istraživanjima u Hrvatskoj, u domu A su se u ovom istraživanju osim AmpC-pozitivnih izolata također pojavili i izolati koji proizvode ESBL, i to predominantno iz CTX-M porodice. Većina bolesnika je prethodno boravila u nekom od velikih bolničkih centara u Zagrebu gdje su vjerojatno prethodno kolonizirani takvim izolatima koje su unijeli u dom, nakon čega je došlo do njihove diseminacije pod

seleksijskim učinkom antibiotika koji se učestalo propisuju u gerijatrijskoj populaciji.

Prema našim saznanjima u literaturi dosad nisu objavljeni podatci o karakterizaciji hospitalnih ESBL ili AmpC-pozitivnih izolata *P. mirabilis* u Hrvatskoj. Nadalje, ovo istraživanje donosi prvi opis CTX-M-15 beta-laktamaze u izolatu *P. mirabilis* u Hrvatskoj. U prethodnim istraživanjima opisana je u *E. coli* izolatima iz KBC-a Zagreb (Rebro) (42,43) i izvanbolničkim izolatima *K. pneumoniae* (44). Također je opisana kao dodatna beta-laktamaza u izolatima *K. pneumoniae* i *Enterobacter cloacae* pozitivnim na metalo-beta-laktamaze iz porodice VIM i NDM (45-47). Urinarni trakt se pokazao kao najvažniji rezervoar multirezistentnih izolata, što se poklapa s rezultatima studija drugih autora. Pretežno su bile zahvaćene osobe s trajnim urinarnim kateterima, a čak su i u vanjskoj populaciji prevladavale osobe starije životne dobi.

CMY beta-laktamaze su tipične plazmidne beta-laktamaze u enterobakterija koje vuku podrijetlo od kromosomskog gena *ampC* bakterijske vrste *Citrobacter freundii* (49). Iako su one tipično plazmidno kodirane, u ovom istraživanju nismo uspjeli dokazati plazmidno podrijetlo gena. Rezistencija na cefotaksim nije prenešena na recipijent ni u pokusu konjugacije, a ni transformacijom, a PCR za inkompatibilne skupine plazmida bio je negativan. Neka istraživanja su dokazala da je došlo do inkorporacije plazmidnog gena u kromosom preko *ISEcp* insercijske sekvence (13), ali u našem istraživanju nije sa sigurnošću potvrđena kromosomska lokacija gena *CMY*. Dodatne bi analize pomoću metoda *Southern blotting* i S1-PFGE bile potrebne da se razjasni točna lokacija gena. CMY beta-laktamaze su, osim u proteusa, opisane i u izolata bakterije *K. pneumoniae* (50). Nadalje, CMY-16 beta-laktamaza je prethodno opisana u izolatima *P. mirabilis* koji su uzrokovali infekcije urinarnog trakta u jednom domu u Italiji, kao i u domu Godan u Zagrebu (13, 26). U ovom istraživanju je zapažen gotovo identičan fenotip rezistencije kod svih CMY-pozitivnih izolata, neovisno o njihovom podrijetlu, za razliku od ESBL izolata koji su iskazivali varijabilan fenotip rezistencije i na cefalosporine i na ostale antibiotike. Osim toga, zapažena je dobra korelacija između fenotipskih testova s inhibitorom (klavulanska i fenilboronična kiselina) i rezultata PCR-a – dakle, može se zaključiti da su fenotipski testovi pokazali vrlo visoku osjetljivost i specifičnost. Svi fenotipski ESBL-pozitivni sojevi su davali produkt s početnicama za beta-laktamaze proširenog spektra, dok su svi fenotipski pozitivni sojevi na AmpC davali produkt s početnicama za CMY. Nije bilo lažno pozitivnih rezultata.

Ova studija pokazuje slične trendove u dinamici rezistencije na cefalosporine proširenog spektra koji su

prethodno opisani i u ostalim europskim zemljama – konkretno, skretanje od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima u važnog izvanbolničkog patogena kao što je *P. mirabilis* (13,51,52). Uz to, iznimno visoke stope rezistencije na ciprofloksacin i gentamicin, kao i potpuna rezistencija na sulfometoksazol/trimetoprim detektirani su i u ESBL i u AmpC-pozitivnih sojeva. Potonje se tumači činjenicom da plazmidi koji kodiraju i jedne i druge beta-laktamaze često sadržavaju i gene rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike. Shodno tome, postoji i mogućnost korištenja gotovih diskova koji sadržavaju fenilboroničnu kiselinu što olakšava testiranje (53).

Precizna laboratorijska identifikacija točnog tipa beta-laktamaze je svakako važna pri pravilnom odabiru terapije (3,54). S terapijskog aspekta za infekcije koje uzrokuju ESBL-pozitivni izolati bi se mogli preporučiti samo karbapenemi ili piperacilin/tazobaktam, dok za AmpC izolate dolazi u obzir i cefepim. Potonji izbor antibiotika tumači se činjenicom da AmpC beta-laktamaze ne hidroliziraju cefepim, iako podatci iz literature navode da je sporna primjena i cefepima zbog mogućnosti razvoja hiperproducerskih u toku terapije koji luče velike količine AmpC beta-laktamaze i imaju smanjenu osjetljivost i na cefepim (55).

Antimikrobni lijekovi koji se često koriste u terapiji infekcija mokraćnog sustava, kao što su fluorokinoloni i kotrimoksazol, pokazali su se potpuno neučinkovitim – kako u ESBL, tako i u AmpC-pozitivnih izolata. Naši ESBL-pozitivni izolati pokazivali su varijabilnu osjetljivost na cefalosporine treće i četvrte generacije; s druge strane, AmpC-pozitivni izolati su bili uniformno rezistentni na treću generaciju, a osjetljivi na četvrtu generaciju cefalosporina. Treba napomenuti kako za AmpC-pozitivne izolate ne postoje preporuke za korekciju antibiograma, premda neki autori preporučuju treću generaciju cefalosporina izdati kao rezistentnu, a četvrtu generaciju cefalosporina sukladno rezultatima testiranja *in vitro* (56).

Daljnja istraživanja ove teme trebala bi se također kretati u smjeru usporedbe genotipova bolničkih i izvanbolničkih izolata (ne samo od bolesnika, nego i iz okoliša) pomoću metoda molekularne epidemiologije te razumijevanja evolucije rezistencije kako bi se proučio potencijalni rezervoar infekcije, ali i mehanizmi te putovi širenja ovog važnog patogenog mikroorganizma. To bi omogućilo i lakše uvođenje preventivnih mjera te uspostavljanje kontrole širenja, a napose probira (skrininga) bolesnika koji dolaze u dom za starije osobe iz bolnice i obrnuto. Nadalje, higijena ruku je i dalje neizostavan korak u prevenciji s naglaskom na osoblje koje dolazi u najuži kontakt s hospitaliziranim i institucionaliziranim bolesnicima, ali i na osobe koje sudjeluju u pripremi i distribuciji hrane.

ZAKLJUČCI

P. mirabilis je sve značajniji uzročnik bolničkih i izvanbolničkih infekcija – uključujući i infekcije u domovima za starije i nemoćne osobe. Ovim istraživanjem dokazali smo perzistenciju AmpC beta-laktamaze iz CMY porodice u izolatima ove bakterijske vrste u jednom domu za starije i nemoćne osobe, ali i diseminaciju takvih izolata u drugom domu i izvanbolničkoj populaciji. Kao i u nekim drugim istraživanjima uočen je trend skretanja beta-laktamaza od TEM varijanti prema CTX-M i CMY tipovima. Shodno tome, pravilna i brza laboratorijska identifikacija tipa cefalosporinaze postaje sve važniji preduvjet za odabir adekvatne terapije. Općenito vrijedi stav da se za infekcije koje uzrokuju ESBL-pozitivni sojevi mogu preporučiti samo karbapenemi ili piperacilin/tazobaktam, dok za AmpC-pozitivne sojeve u obzir dolazi i primjena cefepima koji ne podliježe hidrolizi AmpC beta-laktamazama. Potrebno je nastaviti s ovim tipom istraživanja kako bi se metodama molekularne epidemiologije utvrdilo širenje multirezistentnih sojeva bakterijske vrste *P. mirabilis* između bolnica, staračkih domova i okoliša.

L I T E R A T U R A

1. Foris LA, Snowden J. *Proteus mirabilis* Infections. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017.
2. Phillipon A, Arlet G, Lagrange H. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 17-29.
3. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
4. Girlich D, Bonnin RA, Bogaerts P i sur. Chromosomal Amplification of the *bla*_{OXA-58} Carbapenemase Gene in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: e01697-16.
5. Bedenić B. β -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji I. dio. Lijec Vjesn 2004; 126: 314-24.
6. Bedenić B. β -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji II. dio. Lijec Vjesn 2005; 127: 12-21.
7. Bedenić B, Sardelić S, Ladavac M. Multirezistentne bakterije. Acta Med Croatica 2015; 69: 211-6.
8. Jacoby GA, Munoz Price LS. The new β -lactamases. N Eng J Med 2005; 352: 380-91.
9. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1-14.
10. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 1: 33-41.

11. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol* 2009; 22: 161-82.
12. Wang JT, Chen PC, Chang SC i sur. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 486.
13. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A i sur. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2735-42.
14. Literacka E, Empel J, Baraniak A, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC type cephalosporinase including two novel enzymes, CMY-14 and CMY-15 in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4136-43.
15. Cherif T, Saidani M, Decre D, Ben-Boubaker I, Arlet G. Cooccurrence of multiple AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 44-51.
16. Schneider I, Markovska R, Marteva-Proeska Y, Miltov I, Bauernfeind A. Detection of CMY-99, a novel AmpC beta-lactamase and VIM-1 in *Proteus mirabilis* isolates in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 620-1.
17. Migliavacca R, Migliavacca A, Nucleo E i sur. Molecular epidemiology of ESBL producing *Proteus mirabilis* isolates from a long-term care and rehabilitation facility in Italy. *New Microbiologica* 2007; 30: 362-6.
18. Datta P, Gupta V, Arora S, Garg S, Chander J. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase, AmpC, and carbapenemase production in *Proteus mirabilis*. *Jpn J Infect Dis* 2014; 67: 44-6.
19. Palzkill T, Thomson KS, Sanders CC, Moland ES, Huang W, Milligan TW. New variant of TEM-10 beta-lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1199-200.
20. Pagani L, Migliavacca R, Pallechi L. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1549-52.
21. Biendo M, Thomas D, Laurans G i sur. Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 395-401.
22. Tian GB, Jiang YQ, Huang YM i sur. Characterization of CTX-M-140, a Variant of CTX-M-14 Extended-Spectrum β -Lactamase with Decreased Cephalosporin Hydrolytic Activity, from Cephalosporin-Resistant *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 6121-6.
23. Chaubey M, Shenoy S. Occurrence of TEM, SHV and CTX-M β lactamases in clinical isolates of *Proteus* species in a tertiary care center. *Infect Disord Drug Targets*. 2017; doi: 10.2174/1871526517666170425125217. [Epub ahead of print]
24. Sardelić S, Bedenić B, Šijak D, Colinson C, Kalenić S. Emergence of *Proteus mirabilis* isolates producing TEM-52 β -lactamase in Croatia. *Chemotherapy* 2010; 56: 208-13.
25. Tonkić M, Mohar B, Sisko-Kraljević K i sur. High prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* isolates in southern Croatia. *J Med Microbiol* 2010; 59: 1185-90.
26. Bedenić B, Firis N, Elvedi-Gašparović V i sur. Emergence of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* in a long-term care facility in Croatia. *Wien Klin Wochenschr* 2016; 128: 404-13.
27. Uzunović S, Ibrahimagić A, Hodžić D, Bedenić B. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of AmpC-and/or extended-spectrum (ESBL) β -lactamase producing *Proteus* spp. clinical isolates in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *Med Glas (Zenica)* 2016; 13: 103-12.
28. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR i sur. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 211-5.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
30. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i sur. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268-81.
31. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
32. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4163-7.
33. Elwell S, Falkow LP. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. U: Lorian V, ur. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2. izd. Baltimore MD: Williams and Wilkins, 1986, 683-721.
34. Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 398-402.
35. Arlet G, Bami G, Decre D i sur. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134: 203-8.
36. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME i sur. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 735-43.
37. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153-62.
38. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 154-5.

39. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219-28.
40. Bedenić B, Matanović K, Mekić S, Varda-Brkić D, Šeol-Martinac B. Coproduction of CTX-M-15 and CMY-2 in animal *Escherichia coli* isolate from Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain; 2014 Book of Abstracts, R060. Dostupno na: ESCMID Online Lecture Library (<https://www.escmid.org/>).
41. Rubić Ž, Šoprek S, Jelić M i sur. The first detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from University Hospital Split, Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain; 2014 Book of Abstracts, P 1027. Dostupno na: ESCMID Online Lecture Library (<https://www.escmid.org/>).
42. Literacka E, Bedenić B, Baraniak A i sur. *bla*_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* strains from Croatian Hospitals are located in new (*bla*_{CTX-M-3a}) and widely spread (*bla*_{CTX-M-3a} and *bla*_{CTX-M-15}) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1630-5.
43. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I i sur. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007; 19: 97-100.
44. Bedenić B, Vraneš J, Bošnjak Z i sur. Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in the community. *Med Glasn* 2010; 7: 32-9.
45. Zujic-Atalić V, Bedenić B, Kocsis E i sur. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia – the results of the multicenter study. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O894-903.
46. Petrosillo N, Vranić-Ladavac M, Feudi C i sur. Spread of *Enterobacter cloacae* carrying *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} and plasmid-mediated quinolone resistance genes in a surgical intensive care unit in Croatia. *J Glob Antimicrob Res* 2016; 4: 44-8.
47. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J i sur. Molecular characterization of class B carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class D carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genet Evol* 2016; 43: 74-82.
48. Bedenić B, Goić-Barišić I, Budimir A i sur. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of selected gram-negative bacilli from two Croatian hospitals: MYSTIC study results. *J Chemother* 2010; 22: 147-52.
49. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K. Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Med J* 1998; 39: 520-5.
50. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamairellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 221-4.
51. Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM i sur. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 328-33.
52. Mac Aogáin M, Rogers TR, Crowley B. Identification of emergent *bla*_{CMY-2}-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. *New Microbes New Infect* 2015; 9: 58-62.
53. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 294-9.
54. Tamma PD, Rodriguez-Bano J. The use of Noncarbapenemctamases beta-Lactams for the treatment of extended-spectrum beta-lactamase infections. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 972-80.
55. Leclercq R, Cantón R, Brown DF i sur. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 141-60.
56. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA i sur. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 294-9.

SUMMARY

CEPHALOSPORINASES IN *PROTEUS MIRABILIS* ISOLATES FROM LONG-TERM CARE FACILITIES AND THE COMMUNITY

T. MEŠTROVIĆ¹, A. LUKIĆ-GRLIĆ^{2,3}, M. BOGDAN⁴, D. BANDIĆ-PAVLOVIĆ⁵, G. CAVRIĆ⁶,
D. DRENJANČEVIĆ^{7,8}, K. B. SRETER⁹, A. BENČIĆ², S. SARDELIĆ¹⁰ and B. BEDENIĆ^{2,5}

¹Dr. Zora Profozić Polyclinic, Clinical Microbiology and Parasitology Unit, Zagreb, Croatia, ²University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia, ³Department of Laboratory Diagnosis, Zagreb Children's Hospital, Zagreb, Croatia, ⁴Microbiology Service, Institute of Public Health of the Osijek-Baranja County, Osijek, Croatia, ⁵Zagreb University Hospital Centre, Zagreb, Croatia, ⁶Internal Medicine Department, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia, ⁷Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine, Osijek, Croatia, ⁸Osijek University Hospital Centre, Osijek, Croatia, ⁹Sestre milosrdnice University Hospital Centre, Zagreb, Croatia, ¹⁰Split University Hospital Centre, Split, Croatia

Proteus mirabilis (*P. mirabilis*) is increasingly recognized as a causative agent of hospital and community acquired infections, including those in long-term care facilities (LTCFs). Previous studies on *P. mirabilis* from Croatia showed the predominance of TEM-52 extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and the emergence of plasmid AmpC beta-lactamases. The aim of the present study was to investigate the evolution and dynamics of cephalosporinases in *P. mirabilis* from LTCFs and to compare the isolates found in the LTCFs with those from a community setting. A total of 41 isolates of *P. mirabilis* resistant to third-generation cephalosporins were collected from two nursing homes and from outpatients from March 2015 until September 2017. Antibiotic susceptibility testing was performed by the broth microdilution method. ESBLs and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases were detected by phenotypic inhibitor-based tests and by polymerase chain reaction (PCR). Plasmids were characterized by utilizing conjugation and transformation experiments, as well as PCR-based replicon typing. All isolates exhibited high level of resistance to amoxicillin alone and in combination with clavulanic acid, as well as to first-, second- and third-generation cephalosporins. Three isolates tested positive in inhibitor-based test with clavulanic acid, and 38 in Hodge test and combined disk test with phenylboronic acid, indicating the production of ESBLs and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases, respectively. Two ESBL-positive organisms yielded amplicons with primers specific for CTX-M beta-lactamase of group 1 and one for TEM. All AmpC-positive organisms were identified by PCR as CMY. CTX-M positive strains harbored IncK plasmid, whereas AmpC-positive strains were negative for known plasmid types. This study demonstrated persistence of CMY beta-lactamases in one LTCF, but also dissemination of the aforementioned resistance determinants to another nursing home and to the community setting. Akin to other studies, there was a trend of cephalosporinase dynamic switch from TEM variants to CTX-M and CMY. Therefore, accurate and swift laboratory identification of cephalosporinase type is becoming pivotal for appropriate choice of treatment.

Key words: Cephalosporinase – genetics; Cephalosporins – pharmacology; *Proteus mirabilis* – genetics; Drug resistance, bacterial – drug effects, genetics; Beta-lactamases – genetics, metabolism; Plasmids – analysis, genetics; Microbial sensitivity tests; Croatia – epidemiology