

Beta-laktamaze proširenog spektra bakterije *Escherichia coli*



Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli*

Hadžić, L., B. Šeol Martinec, S. Pintarić*

Sažetak

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) jest gram-negativna štapičasta bakterija koja čini znatan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, a istodobno je i jedna od najčešćih uzročnika infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini. U liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom najčešće se, zbog njihova širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti, koriste beta-laktamski antimikrobni lijekovi. No nepotrebna, prekomjerna i često neodgovarajuća primjena antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame kod bakterije *E. coli* jest tvorba enzima beta-laktamaza koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika čineći ga nedjelotvornim. Dosad su otkrivene i opisane brojne vrste beta-laktamaza, a osobito su važne beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamase*, ESBL). To su enzimi koji razgrađuju peniciline, cefalosporine i monobaktame, ali ne i cefamicine i karbapeneme, a inhibiraju ih inhibitori beta-laktamaza, kao što je klavulanska kiselina. Među njima najveću kliničku važnost imaju enzimi CTX-M, potom skupine enzima TEM i SHV, a sve su navedene skupine raširene u cijelom svijetu. Geni odgovorni za tvorbu ESBL-a većinom se nalaze na plazmidima pa se lako prenose iz jedne bakterijske stanice u drugu, a uz njih se često nalaze i geni odgovorni za rezistenciju na lijekove drugih skupina, što izolate čini multirezistentnima. Zbog ograničenih terapijskih mogućnosti i opasnosti od stjecanja novih mehanizama rezistencije sojevi koji tvore ESBL velik su izazov za sve mikrobiologe i kliničare. Stoga je pravodobno prepoznavanje i dokaz rezistentnih sojeva od presudne važnosti prije primjene antimikrobnog lijeka i u humanoj i u veterinarskoj medicini. Osim toga nužna je kontinuirana edukacija koja naglašava potrebu za racionalnom primjenom antibiotika i suzbijanjem širenja rezistentnih i multirezistentnih izolata.

28

Ključne riječi: *Escherichia coli*, mikrobna rezistencija, beta-laktamaze, ESBL

Abstract

Escherichia coli (*E. coli*) is a Gram-negative, rod-shaped bacterium found in the gastrointestinal tract of warm-blooded animals and humans as part of the normal intestinal microbiota, but is also one of the most common causes of bacterial infections in human and veterinary medicine. Because of their broad spectrum and low toxicity, beta-lactam antimicrobials are currently the most widely used class of antibacterial agents

Lana HADŽIĆ, dr. med. vet., Laboratorij za mikrobiologiju hrane, vode i hrane za životinje, J.U. „Veterinarski zavod“ Bihać; dr. sc. Branka ŠEOL MARTINEC, dr. med. vet., redovita profesorica u trajnom zvanju; dr. sc. Selma PINTARIĆ, dr. med. vet., docentica, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. *Dopisni autor: doc. dr. sc. Selma Pintarić, e-pošta: selma.pintaric@vef.unizg.hr

for the treatment of infections caused by *E. coli* strains. However, the widespread and often inappropriate use of antimicrobials has led to the emergence of resistant bacterial isolates. The predominant mechanism of β -lactam resistance in *E. coli* is the production of β -lactamases, which inactivate antibiotics by hydrolysis of the β -lactam ring. To date, many different β -lactamases have been detected, with extended spectrum β -lactamases (ESBLs) being the most important. ESBLs are enzymes capable of hydrolyzing penicillins, cephalosporins, and monobactams, but not cephamycins or carbapenems, and are inhibited by β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid. The predominant and clinically the most important ESBLs belong to the CTX-M family, followed by the TEM and SHV families, which are found throughout the world. ESBLs are often encoded by genes located on plasmids, allowing them to spread among bacteria, and they also carry genes for resistance to other classes of antimicrobial agents, making bacterial strains multidrug resistant. Due to the limited therapeutic options and the risks associated with the acquisition of new resistance mechanisms, ESBL-producing strains pose a major challenge to microbiologists and clinical therapists. Therefore, laboratory detection of resistant strains is of great importance prior to the use of an antimicrobial agent in human and veterinary medicine. Moreover, continuous education emphasizing the rational use of antibiotics is necessary to prevent the spread of resistant and multidrug-resistant bacteria.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, β -lactamases, ESBLs

Uvod

Bakterijska vrsta *Escherichia coli* (*E. coli*) jest gram-negativna štapičasta bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* koja čini znatan dio mikrobiote crijeva svih toplokrvnih životinja, ali je istodobno i jedna od najčešćih uzročnika najrazličitijih infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini.

Sojevi bakterije *E. coli* mogu se podijeliti u dvije skupine. Prvu skupinu čine komenzali koji, kao dio crijevne mikrobiote, za zdrav organizam nisu štetni. Drugoj skupini pripadaju patogeni sojevi koji uzrokuju crijevne i izvancrijevne infekcije u zdravih jedinki.

Bakterija *E. coli* urođeno je osjetljiva na mnoge antimikrobne lijekove pa se u liječenju infekcija uzrokovanih ovom bakterijom, kao i ostalih gram-negativnih bakterija, primjenjuju beta-laktamski antibiotici, fluorokinoloni, aminoglikozidi, sulfonamidi, tetraciklini i nitrofurantoin (Doi i sur., 2017.). No prekomjerna i često neodgovarajuća primjena antibiotika rezultirala je selekcijom sojeva otpornih na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Enterobakterije mogu razviti rezistenciju promjenom ciljnog mjesta vezanja lijeka, proizvodnjom enzima koji inaktiviraju lijek, mehanizmom pojačanog izbacivanja lijeka iz stanice ili smanjenom propusnošću stanične stijenke za prolazak antimikrobnog lijeka. Kod vrste *E. coli* osobito je važna stečena rezistencija na beta-laktamske antibiotike koji se najčešće primjenjuju u liječenju infekcija zbog njihova širokog spektra djelovanja i niske toksičnosti. Kod gram-negativnih bakterija, pa tako i kod vrste *E. coli*, najčešći mehanizam odgovoran za rezistenciju na beta-laktame jest tvorba enzima beta-laktamaza koji hidroliziraju beta-laktamski prsten antibiotika čineći ga nedjelotvornim (Andrašević i sur., 2009.).

Beta-laktamaze

Beta-laktamaze su bakterijski enzimi koji hidrolizom razgrađuju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina, monobaktama i karbapenema, a proizvode ih i gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Beta-laktamaze gram-negativnih bakterija nalaze se u periplazmatskom prostoru bakterijske stanice te inaktiviraju antibiotik prije nego što stigne do ciljnog mjesta, dok gram-pozitivne bakterije uglavnom proizvode ekstracelularne beta-laktamaze (Livermore, 1995.).

Djelotvornost beta-laktamaza ovisi o njihovu afinitetu za određeni supstrat, brzini hidrolize supstrata, količini izlučenoga enzima i propusnosti vanjske membrane gram-negativnih bakterija (Bedenić, 2004.). Beta-laktamaze sa serinskim aktivnim mjestom inaktiviraju peniciline, cefalosporine i monobaktame, a enzimi koji pomoću iona cinka (Zn^{2+}) inaktiviraju beta-laktamski prsten penicilina, cefalosporina i karbapenema čine manji broj beta-laktamaza i nazivaju se metalo-beta-laktamaze (engl. *metallo-beta-lactamases*, MBLs) (Livermore, 1995.).

Prema genetskom podrijetlu beta-laktamaze mogu biti kromosomske ili plazmidne. Kromosomske beta-laktamaze kodirane su genima smještenima na bakterijskom kromosomu, a rezistencija posredovana njima može biti konstitutivna ili inducibilna. Konstitutivne beta-laktamaze neprekidno se stvaraju neovisno o prisutnosti antibiotika. Inducibilne beta-laktamaze stvaraju se u znatnim količinama samo kad je bakterijska stanica izložena djelovanju beta-laktamskih antibiotika (Livermore, 1995.).

Plazmidne beta-laktamaze kodirane su genima smještenima na pokretnim genskim elementima kao što su plazmidi i transpozoni. Rezistencija koju uzrokuju prenosiva je iz jedne bakterijske stanice u drugu i za razliku od kromosomskih beta-laktamaza nisu specifične za vrstu pa se mogu širiti među različitim bakterijskim vrstama i rodovima (Samaha-Kfoury i sur., 2003.). Stoga je zbog pravilna odabira djelotvornog antimikrobnog lijeka iznimno važno što prije otkriti je li riječ o infekciji rezistentnim sojevima (Bedenić, 2004.). Nadalje, geni koji kodiraju beta-laktamaze najčešće se na plazmidima nalaze zajedno s genima odgovornima za rezistenciju na druge skupine antimikrobnih lijekova kao što su aminoglikozidi, tetraciklini i sulfonamidi, što dodatno komplicira liječenje (Bedenić i sur., 2015.).

Osim prema genetskom podrijetlu i načinu ekspresije aktivnosti, beta-laktamaze možemo podijeliti prema funkcionalnim i molekularnim značajkama. Postoji više funkcionalnih podjela koje se temelje na hidrolitičkoj aktivnosti enzima (supstratnom profilu), osjetljivosti na inhibitore beta-laktamaza, izoelektričnoj točki i molekularnoj masi. Danas je u primjeni Bush-Jacoby-Medeirosova funkcionalna podjela na temelju koje su beta-laktamaze podijeljene prema fenotipskim obilježjima (spektar djelovanja na odgovarajuće beta-laktame i osjetljivost na inhibitore beta-laktamaza) u četiri skupine i niz podskupina (Bush i sur., 1995.; Bush, 2001.). Supstratni profil određuje se na temelju brzine razgradnje određenog supstrata, pa tako razlikujemo penicilinaze, cefalosporinaze i druge enzime. Nedostatak ovakve podjele nalazi se u činjenici da točkaste mutacije gena koji kodiraju za beta-laktamaze znatno mijenjaju specifičnost prema supstratu i osjetljivost na inhibitore te na taj način mijenjaju skupinu u koju je enzim svrstan (Bedenić, 2004.).

Molekularna podjela temelji se na određivanju slijeda nukleotida i aminokiselina, pa tako Amblerova podjela dijeli beta-laktamaze u četiri skupine označene slovima od A do D. Skupini A, C i D pripadaju serinske beta-laktamaze koje na svom aktivnom mjestu posjeduju aminokiselinu serin, dok skupinu B čine metalo-beta-laktamaze koje za svoju aktivnost zahtijevaju cinkove ione (Ambler i sur., 1991.).

Kronologija otkrića beta-laktamaza

Klinička uporaba penicilina koja je započela 1944. godine djelovala je selekcijski na stafilokoke s plazmidnim genima koji kodiraju za penicilinaze, pa je sredinom 80-ih godina više od 90 % stafilokoka bilo otporno na penicilin (Bradford, 2001.). Uvođenje be-

ta-laktamskih antibiotika djelotvornih protiv gram-negativnih bakterija 60-tih godina prošlog stoljeća rezultiralo je razvojem sličnih mehanizama rezistencije, kad se pojavljuju i prve plazmidne beta-laktamaze šireg spektra od penicilinaza odgovorne za rezistenciju na peniciline i cefalosporine prve generacije. Toj skupini pripadaju TEM-1, TEM-2, SHV-1, ROB, BRO, OXA i PSE beta-laktamaze. Najzastupljenija plazmidna beta-laktamaza jest TEM-1 beta-laktamaza prvi put dokazana 1965. godine kod bakterije *E. coli*, a nakon toga i kod brojnih drugih enterobakterija. Danas oko 20 – 60 % enterobakterija, ovisno o geografskom području i vrsti bakterije, posjeduje TEM-1 beta-laktamazu (Bedenić, 2004.).

Dvadesetak godina nakon otkrića prvih plazmidnih beta-laktamaza sintetizirani su novi beta-laktamski antibiotici otporni na hidrolitičko djelovanje TEM-1 i SHV-1 beta-laktamaza. Tada se za liječenje infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama počinju primjenjivati oksiiimino-cefalosporini (cefotaksim, ceftazidim, ceftriakson). No pretjerana upotreba cefalosporina treće generacije, zbog selekcijskog pritiska, rezultirala je pojavom mutacija u genima za TEM i SHV enzime i omogućila prilagodbu bakterija na nove beta-laktamske antibiotike (Bradford, 2001.). Novonastali enzimi iz TEM i SHV porodice hidroliziraju cefalosporine prve, druge i treće generacije, aminopeniciline i monobaktame, ali ne i karbapeneme, a osjetljivi su na djelovanje klavulanske kiseline, tazobaktama i sulbaktama (Gniadkowsky, 2001.; Bedenić, 2004.; Patterson i Bonomo, 2005.).

Prvi u nizu novih beta-laktamaza, enzim SHV-2, izdvojen u Njemačkoj iz bakterijske vrste *Klebsiella ozaenae*, djelovao je na sve postojeće cefalosporine te su on i svi poslije otkriveni enzimi nazvani beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended spectrum β -lactamase*, ESBL) (Kliebe i sur., 1985.).

Ubrzo nakon pojave derivata enzima TEM i SHV pojavila se nova skupina enzima koja ima visoki afinitet za cefotaksim, pa je nazvana CTX-M, a vrlo se brzo proširila i postala dominantna skupina beta-laktamaza proširenog spektra (Poirel i sur., 2002.).

Osim navedenih skupina ESBL-a, dokazane su i brojne nesrodne beta-laktamaze slična djelovanja. To su primjerice enzimi skupine OXA koji djeluju na oksiiimino-cefalosporine, a slabije ih inhibira klavulanska kiselina; plazmidne AmpC cefalosporinaze koje djeluju na cefalosporine, a otporne su na djelovanje klavulanske kiseline i GES enzimi koji imaju ista svojstva kao ESBL s djelovanjem i na karbapeneme (Bradford, 2001.; Philippon, 2002.; Queenan i Bush, 2007.).

Osim u humanoj medicini, pojava i širenje beta-laktamaza, pa tako i ESBL-a, zabilježena je i u veterinarskoj medicini. Bakterije koje tvore ESBL izdvojene su iz gotovo svih domaćih i nekih divljih životinja, iz njihova neposrednog okoliša te iz proizvoda životinjskog podrijetla (Nobrega i Brocchi, 2014.). Danas se životinje i njihovi proizvodi, kao što su kozje i ovčje mlijeko te meso peradi, smatraju važnim rezervoarima ESBL pozitivnih bakterija koje su prijeteći problem javnom zdravlju (Alegria i sur., 2020.). U istraživanjima provedenima u veterinarskoj medicini u Hrvatskoj zabilježeni su sojevi bakterije *E. coli* koji tvore TEM beta-laktamaze izdvojeni iz crijeva svinja, CTX-M pozitivni sojevi *E. coli* izdvojeni iz pasa te izolati bakterije *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) izdvojeni iz pasa, a koji su istodobno tvorili i TEM i CTX-M beta-laktamaze (Kompes, 2010.; Bedenić i sur., 2014.; Pintarić i sur., 2017.).

Beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL)

Većina ESBL-a derivati su TEM ili SHV enzima i nalazimo ih kod bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae*, najčešće u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*. Uzrok su rezistencije na peniciline, cefalosporine (uključujući treću i četvrtu generaciju) i monobaktame (aztreonam), ali ne i na cefamicine (cefoksitin) i karbapeneme (Patterson i Bonomo, 2005.). Sojevi koji tvore ESBL osjetljivi su na djelovanje inhibitora beta-laktamaza kao što su klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam (Gniadkowsky, 2001.).

Prema Bush-Jacoby-Medeirosvoj podjeli ESBL pripadaju skupini 2be i onim beta-laktamazama iz skupine 2d koje dijele osnovne karakteristike skupine 2be (Bush i sur., 1995.; Bush, 2001.). Prema Amblerovoj klasifikaciji svrstane su u molekularnu skupinu A uz iznimku OXA skupine enzima koja se nalazi u skupini D (Ambler i sur., 1991.).

TEM beta-laktamaze proširenog spektra

Najčešća beta-laktamaza pronađena kod gram-negativnih bakterija jest TEM-1 beta-laktamaza. Kod gotovo 90 % sojeva *E. coli* rezistentnih na ampicilin rezistencija je posredovana TEM-1 beta-laktamazom (Livermore, 1995.). Osim na ampicilin TEM-1 beta-laktamaza uzrokuje i rezistenciju na penicilin te cefalosporine starijih generacija, poput cefalotina i cefaloridina (Bradford, 2001.). Enzim TEM-2 prvi je derivat TEM-1 beta-laktamaze od koje se razlikuje samo po jednoj promjeni u aminokiselinskom sastavu, a koja nije uzrokovala promjenu supstratnog profila (Bradford, 2001.). Beta-laktamaza TEM-3, iz-

dvojena 1989. godine, prva je beta-laktamaza koja rezistentnom soju daje ESBL fenotip (Sougakoff i sur., 1988.). Nastala je od TEM-2 beta-laktamaze od koje se razlikuje u dvije aminokiseline u proteinskom slijedu: mutacija na kodonu 102 promijenila je aminokiselinu glutamin u aminokiselinu lizin, a na kodonu 236 aminokiselinu glicin u aminokiselinu serin (Sougakoff i sur., 1988.).

Velik broj točkastih mutacija na različitim pozicijama rezultirao je velikim brojem različitih TEM beta-laktamaza (Hujer i sur., 2001.). Iako ih najčešće nalazimo kod enterobakterija, posebice u vrsta *E. coli* i *K. pneumoniae*, nalazimo ih i u gram-negativnih bakterija koje ne pripadaju toj porodici (Bradford, 2001.). Primjerice TEM-42 beta-laktamaza pronađena je kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (Mugnier i sur., 1996.).

SHV beta-laktamaze proširenog spektra

SHV beta-laktamaze najčešće nalazimo kod bakterijske vrste *K. pneumoniae*, a dokazane su i kod sojeva *E. coli*, *Citrobacter diversus* i *P. aeruginosa* (Bradford, 2001.). Kod bakterijske vrste *K. pneumoniae* SHV beta-laktamaza kodirana je genima smještenima na kromosomu, dok je u ostalih bakterijskih vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* kodirana plazmidnim genima (Livermore, 1995.).

Zbog manjeg broja mutacija na genima koji kodiraju za SHV beta-laktamaze, ne postoji tako velik broj derivata ovog enzima kao što je to slučaj kod TEM beta-laktamaza. Većina derivata SHV beta-laktamaza uzrokuje ESBL fenotip kod rezistentnih sojeva, iako je dosad pronađena jedna varijanta, SHV-10, koja je otporna na djelovanje inhibitora beta-laktamaza, što nije karakteristika beta-laktamaza proširenog spektra (Prinarakis i sur., 1997.).

CTX-M beta-laktamaze proširenog spektra

Relativno nova skupina plazmidnih ESBL-a ima velik afinitet prema cefotaksimu, pa je prema tome cijela skupina dobila naziv CTX-M beta-laktamaze (Poirel i sur., 2002.; Dutour i sur., 2002.). Ovi enzimi hidroliziraju cefalotin ili cefaloridin bolje od benzilpenicilina i pokazuju veći afinitet za cefotaksim nego za ceftazidim (Bradford i sur., 1998.). Osjetljivi su na inhibitore beta-laktamaza, a tazobaktam ih inhibira bolje nego sulbaktam ili klavulanska kiselina (Bradford, 2001.). CTX-M beta-laktamaze nisu usko povezane s TEM i SHV beta-laktamazama, a s njima pokazuju samo oko 40 % sličnosti u slijedu aminokiseline (Bradford, 2001.).

Smatra se da su CTX-M enzimi potekli od kromosomske AmpC beta-laktamaze bakterijske vrste *Kluyvera ascorbata* zbog velike sličnosti s tim enzimom (Bradford, 2001.). Prva CTX-M beta-laktamaza, nazvana CTX-M-1, otkrivena je početkom devedesetih godina u Njemačkoj u izolatu bakterije *E. coli* (Bauernfeind i sur., 1990.). Nakon toga otkriven je niz sličnih enzima rezistentnih na cefotaksim koji se danas prema svom aminokiselinskom sastavu dijele u nekoliko skupina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (Ramos, 2020.).

Iako je prva CTX-M beta-laktamaza otkrivena krajem 80-ih godina, ovi enzimi nisu bili prošireni do prvog desetljeća 2000-tih godina. Tada je uočeno njihovo širenje u cijelom svijetu, a za njihovu sve veću rasprostranjenost najodgovornijom se smatra bakterija *E. coli* (Canton i sur., 2012.). Danas su CTX-M beta-laktamaze najrasprostranjenija skupina ESBL kod izolata humanog i životinjskog podrijetla (Valentin i sur., 2014.; Bedenić i sur., 2015.; Gundran i sur., 2019.).

OXA beta-laktamaze

Beta-laktamaze skupine OXA odgovorne su za rezistenciju na aminobenzil-peniciline (ampicilin) i prvu generaciju cefalosporina (cefalotin), a slabo su inhibirane klavulanskom kiselinom (Bush i sur., 1995.). Nadalje, pokazuju znatnu hidrolitičku aktivnost prema oksacilinu i kloksacilinu prema čemu su dobile naziv oksacilinaze (engl. *oxacilin hydrolysing*, OXA) (Bush i sur., 1995.). Porodica OXA enzima danas je druga prema veličini porodica β -laktamaza, a pojedini njezini pripadnici uzrokuju ESBL fenotip koji većinom podrazumijeva rezistenciju na ceftazidim. Najčešći predstavnici skupine OXA jesu enzimi OXA-1 i OXA-10 te njihovi derivati (Bush i sur., 1995.).

OXA beta-laktamaze karakteristične su za vrstu *P. aeruginosa* kod koje su prvi put i dokazane (Bradford, 2001.; Poirel i sur., 2001.). U Velikoj Britaniji kod bakterijske vrste *Acinetobacter baumannii* dokazana je OXA-23, beta-laktamaza koja hidrolizira karbapeneme i ima samo 36 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu s OXA-10 (Poirel i sur., 2001.).

AmpC beta-laktamaze

Kromosomske AmpC beta-laktamaze posjeduju sve enterobakterije osim onih iz rodova *Salmonella* i *Klebsiella* te bakterijskih vrsta *P. mirabilis*, *Shigella flexneri* i *Shigella dysenteriae* (Philippon i sur., 2002.). Njihova je ekspresija inducibilna, osim u bak-

terijskih vrsta *E. coli* i roda *Shigella* u kojih je obično konstitutivna i niske razine (Livermore, 1995.).

AmpC beta-laktamaze razgrađuju peniciline, cefalosporine druge i treće generacije te monobaktame (aztreonam), ali za razliku od ESBL-a, razgrađuju i cefamicine (cefoksitin), a nisu osjetljive na komercijalno dostupne inhibitore beta-laktamaza (Black i sur., 2005.).

Plazmidne AmpC beta-laktamaze nastale su prijenosom kromosomskog gena *ampC* na plazmid što je omogućilo prijenos tog gena između bakterija istih ili različitih vrsta (Bedenić i sur., 2015.), nisu inducibilne i to ih razlikuje od kromosomskih AmpC beta-laktamaza (Thomson, 2001.).

Prva plazmidna AmpC beta-laktamaza odgovorna za otpornost na cefamicine, peniciline, oksimino-cefalosporine i monobaktame otkrivena je krajem 80-ih godina u izolatu *K. pneumoniae*, a mogla se prenijeti na izolat *E. coli* (Bauernfeind i sur., 1989.). Enzim je nazvan CMY-1 zbog svoje aktivnosti na cefamicine i veće je osjetljivosti na sulbaktam negoli na klavulansku kiselinu ili tazobaktam (Philippon i sur., 2002.).

Do danas je poznato više različitih tipova ovih enzima, kao što su MIR, CMY, BIL, FOX, MOX ili LAT, a najčešći i geografski najzastupljeniji jest enzim CMY-2 (Philippon i sur., 2002.).

Ostali ESBL-i

Većina beta-laktamaza proširenog spektra djelovanja derivat su TEM ili SHV beta-laktamaza ili se mogu svrstati u neku od novijih porodica ESBL-a. No posljednjih dvadesetak godina otkrivene su i drugi ESBL-i koji nisu srodne dotad opisanim skupinama enzima (Bradford, 2001.).

Prvi je takav enzim PER-1 beta-laktamaza otkrivena u Turskoj u izolatu *P. aeruginosa*, a poslije i u drugih bakterija kao što su *S. Typhimurium* i *Acinetobacter baumannii*. Beta-laktamaza PER-2, također dokazana kod sojeva *S. Typhimurium*, posjeduje 86 % sličnosti u aminokiselinskom slijedu s PER-1 beta-laktamazom. Još jedan enzim povezan s PER-1 beta-laktamazom jest VEB-1 beta-laktamaza izolirana iz bakterije *E. coli* izdvojene iz pacijenta u Vijetnamu, ali je potom dokazana i u izolatu bakterijske vrste *P. aeruginosa* izolirane iz pacijenta s Tajlanda. Sljedeći enzim povezan s prethodnima jest CME-1, izoliran iz bakterijske vrste *Chryseobacterium meningosepticum*. Peti enzim u ovoj skupini jest TLA-1 utvrđen u izolatu bakterije *E. coli* izolirane iz pacijenta u Meksiku (Bradford, 2001.).

Navedene beta-laktamaze (PER-1, PER-2, VEB-1, CME-1, TLA-1) pokazuju samo 40 – 50 % sličnosti u strukturi, a razlog su otpornosti na oksimiino-cefalosporine (osobito ceftazidim) i aztreonam (Bradford, 2001.).

Ovoj skupini pripadaju i slabije zastupljene SFO-1 i GES-1 beta-laktamaze slična djelovanja kao ESBL (Bradford, 2001.; Shaikh i sur., 2015.).

Beta-laktamaze otporne na inhibitore beta-laktamaza

Ova skupina beta-laktamaza otpornih na djelovanje inhibitora beta-laktamaza (engl. *inhibitor resistant*, IRT) nije odgovorna za ESBL fenotip, ali o njima se najčešće raspravlja zajedno s ESBL-om jer su također derivati enzima TEM ili SHV (Bradford, 2001.).

Početak 1990-ih godina otkrivene su beta-laktamaze otporne na djelovanje klavulanske kiseline, a sekvenciranjem je dokazano da su ti enzimi varijante TEM-1 i TEM-2 beta-laktamaza. Nazvane su TRI-1 i TRI-2 (engl. *TEM resistant to β -lactamase inhibitors*, TRI) (Bradford, 2001.).

Dokazano je najmanje 19 različitih vrsta inhibitor-rezistentnih TEM beta-laktamaza, a najčešće se nalaze u sojeva *E. coli*, a potom i u vrsta *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) i *Citrobacter freundii* (Bradford, 2001.).

Iako su inhibitor-rezistentni TEM enzimi otporni na djelovanje klavulanske kiseline i sulbaktama, te samim time i na kombinaciju beta-laktamskog antibiotika s navedenim inhibitorima (amoksicilin-klavulanska kiselina, tikarcilin-klavulanska kiselina i ampilicilin-klavulanska kiselina), osjetljivi su na djelovanje inhibitora tazobaktama, odnosno kombinaciju piperacilina i tazobaktama (Bradford, 2001.).

Točkaste mutacije koje dovode do IRT fenotipa pojavljuju se na nekoliko specifičnih mjesta unutar strukturnog gena za enzim TEM: metionin-69, arginin-244, arginin-275 i asparagin-276. Pozicije ovih mutacija razlikuju se od onih koje dovode do ESBL fenotipa (Bradford, 2001.).

Laboratorijska dijagnostika ESBL-a

Sve veći broj ESBL pozitivnih enterobakterija zahtijeva razvoj odgovarajućih laboratorijskih postupaka kojima će se pouzdano moći dokazati prisutnost ovih enzima u kliničkim izolatima.

Prema smjernicama Instituta za standarde u kliničkom laboratoriju (Clinical Laboratory Standard Institution, CLSI) za prepoznavanje tvorbe ESBL-

a kod vrsta *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* i *P. mirabilis* provodi se inicijalni probirni test pomoću disk-difuzijskog postupka s dijagnostičkim diskovima cefpodoksima, ceftazidima, aztreonama, cefotaksima i ceftriaksona. Ako se dokaže smanjena osjetljivost na neki od spomenutih antibiotika, provode se testovi za dokazivanje tvorbe ESBL-a koji se dijele na fenotipske i molekularne postupke.

Postupci fenotipske dijagnostike

Fenotipski postupci temelje se na sinergijskom djelovanju cefalosporina treće generacije, kao što su ceftazidim i cefotaksim, i nekog inhibitora beta-laktamaza, najčešće klavulanske kiseline. Mogu se provesti na više načina, a uobičajeno su u uporabi postupak kombiniranih diskova i postupak dvostrukog disk-sinergijskog testa (DDST).

Prema smjernicama CLSI-ja nakon pozitivnog probirnog testa provodi se postupak kombiniranih diskova kao potvrdni test za tvorbu ESBL-a. Na Petrijevu ploču (Ø 90 mm) s Mueller-Hintonovim agarom nanosi se ispitivani izolat te se nakon kratkoga sušenja na ploču postavljaju dijagnostički antibiotski diskovi ceftazidima i cefotaksima i diskovi istih antibiotika uz dodatak klavulanske kiseline. Ploče se inkubiraju 18 – 24 sata na 35 – 37 °C. Klavulanska kiselina inhibira djelovanje ESBL-a te na taj način povećava osjetljivost pretraživanog izolata na cefalosporine. Prema kriterijima CLSI-ja povećanje zone inhibicije od 5 mm i više u korist diska koji sadržava klavulansku kiselinu smatra se ESBL pozitivnim testom (Anonymus, 2018.).

U rutinskom radu kliničkih mikrobioloških laboratorija primjenjuje se i dvostruki disk-sinergijski test. Na Petrijevu ploču (Ø 90 mm) s Mueller-Hintonovim agarom nanosi se istraživani izolat te se na ploču postavljaju tri dijagnostička diska. U sredinu se postavlja disk s amoksicilin-klavulanskom kiselinom, a sa svake strane po jedan od cefalosporina treće generacije (ceftazidim, ceftriakson, cefotaksim). Diskovi se postavljaju tako da udaljenost od sredine jednog diska do sredine drugog diska iznosi 20 mm. Ako izolat tvori ESBL, dolazi do širenja inhibicijske zone cefalosporina prema disku s klavulanskom kiselinom (Thomson i sur., 1992.).

Postupci molekularne dijagnostike

Budući da fenotipske metode dokazuju samo prisutnost i tvorbu ESBL-a u ispitivanom soju, razvijene su brojne molekularne metode za dokaz i identifikaciju ESBL gena.

Za detekciju ESBL-a u uporabi su lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), oligotipizacija (engl. *oligotyping*), analiza dužine restrikcijskih odsječaka (engl. *restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction*, PCR-RFLP) i analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (engl. *polymerase chain reaction single-strand conformational polymorphism*, PCR-SSCP).

Lančana reakcija polimerazom najčešći je molekularni postupak za dokaz prisutnosti i identifikaciju beta-laktamaza, u kojoj se koriste oligonukleotidne početnice (*prajmeri*, engl. *primers*) specifične za gene pojedinih skupina i tipova beta-laktamaza (Bradford, 2001.).

Liječenje

Bakterije koje posjeduju gene za ESBL sposobne su razgraditi mnoge beta-laktamske antibiotike, što znatno sužava izbor lijekova za liječenje infekcija uzrokovanih tim sojevima. Iako su *in vitro* ESBL sojevi *E. coli* osjetljivi na pojedine cefalosporine te kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza, navedeni lijekovi i njihove kombinacije rijetko su prvi izbor u liječenju (Gundran i sur., 2019.). Nadalje, geni koji kodiraju za ESBL na plazmidima najčešće dolaze zajedno s genima odgovornima za rezistenciju na druge skupine antimikrobnih lijekova, kao što su aminoglikozidi, tetraciklini i sulfonamidi, što dodatno komplicira liječenje (Bedenić i sur., 2015.). Stoga su karbapenemi u humanoj medicini često prvi izbor u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae* (Shaikh i sur., 2015.). No s obzirom na sve učestaliju pojavu sojeva rezistentnih i na karbapeneme, te zbog nedostatka djelotvornih antimikrobnih lijekova, u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim bakterijama iz porodice *Enterobacteriaceae* također se mogu primjenjivati i neki stariji lijekovi, kao što su fosfomicin i kolistin (Shaikh i sur., 2015.; Mazzariol i sur., 2017.; Gundran i sur., 2019.). Ovakav je profil multirezistentnih izolata velik problem u humanoj medicini jer se najčešće nalaze u bolnicama gdje uzrokuju infekcije koje se uobičajeno nazivaju hospitalnim, bolničkim ili nozokomijalnim. Zbog izrazito suženog izbora antibiotika djelotvornih u liječenju ovih infekcija, sojevi *E. coli* koji istodobno tvore ESBL i karbapenemaze našli su se visoko na listi mikroba koji ugrožavaju ljudsko zdravlje i zbog kojih je potrebno sintetizirati nove antibiotike, a koju je 2017. godine izdala Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO).

Zaključak

Zbog bakterijske tvorbe beta-laktamaza neprestano se povećava učestalost infekcija uzrokovanih bakterijama otpornim na beta-laktamske antibiotike. Budući da ovu vrstu rezistencije osobito potiče nepotrebna, prekomjerna ili neodgovarajuća upotreba antibiotika, mjere kontrole prilikom njihove upotrebe iznimno su važne u kontroli širenja ESBL pozitivnih sojeva. Činjenica je da se geni koji kodiraju ESBL lako šire među bakterijama iste, ali i različitih vrsta, velik problem i u humanoj i u veterinarskoj medicini koje se, kako danas znamo, stalno susreću i isprepleću. Zbog ograničenih terapijskih mogućnosti i opasnosti od stjecanja novih mehanizama rezistencije sojevi koji tvore ESBL velik su izazov za sve mikrobiologe i kliničare. Stoga je prepoznavanje i dokaz rezistentnih sojeva od presudne važnosti prije primjene antimikrobnog lijeka i u humanoj i u veterinarskoj medicini.

Kontinuirani nadzor nad širenjem ESBL pozitivnih izolata, uz multidisciplinarnu suradnju u okviru pristupa *Jedno zdravlje* (engl. *One health*), nužan je kako bi se ovaj problem barem donekle držao pod kontrolom.

Literatura

- ALEGRIA, A., M. ARIAS-TEMPRANO, I. FERNÁNDEZ-NATAL, J. M. RODRÍGUEZ-CALLEJA, M. GARCÍA-LÓPEZ, J. SANTOS (2020): Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 17, 1-9.
- AMBLER, R. P., A. F. COULSON, J. M. FRERE, J.M. GHUYSEN, B. JORIS, M. FORSMAN, R. C. LEVESQUE, G. TIRABY, S. G. WALEY (1991): A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 276, 269-270.
- ANDRAŠEVIĆ, S., M. VRANIĆ-LADAVAC, A. TAMBIĆ-ANDRAŠEVIĆ (2009): Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik*. 29, 171-176.
- ANONYMUS (2018): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eighth edition. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- BAUERNFEIND, A., Y. CHONG, S. SCHWEIGHART (1989): Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infect*. 17, 316-321.
- BAUERNFEIND, A., H. GRIMM, S. SCHWEIGHART (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18, 294-298.

- BEDENIĆ, B. (2004): β -LAKTAMAZE U LABORATORIJU I NJIHOVA ULOGA U REZISTENCIJI. I. DIO: Evolucija bakterijske rezistencije uzrokovane β -laktamazama. Liječ. Vjesn. 126, 314-324.
- BEDENIĆ, B., K. MATANOVIĆ, S. MEKIĆ, D. VARDA-BRKIĆ, B. ŠEOL-MARTINEC (2014): Co-production of CTX-M-15 i CMY-2 in animal *Escherichia coli* isolate from Croatia. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10-13 May. Barcelona, Španjolska.
- BEDENIĆ, B., S. SARDELIĆ, M. LADAVAC (2015): Multirezistentne bakterije. Acta. Med. Croat. 69, 211-216.
- BLACK, A., E. SMITH MOLLAND, K. S. THOMSON (2005): AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC-lactamases. J. Clin. Microbiol. 43, 3110-3113.
- BRADFORD, P. A., Y. YANG, D. SAHM, I. GROPE, D. GARDOVSKA, G. STORCH (1998): CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1980-1984.
- BRADFORD, P. A. (2001): Extended spectrum beta-lactamases in 21st century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14, 933-951.
- BUSH, K., G. A. JACOBY, A. A. MEDEIROS (1995): A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211-1233.
- BUSH, K. (2001): New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis. 32, 1085-1089.
- CANTON, R., J. M. GONZÁLEZ-ALBA, J. C. GALÁN (2012): CTX-M enzymes: origin and diffusion. Front. Microbiol. 3, 1-19.
- DOI, Y., A. IOVLEVA, R. A. BONOMO (2017): The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ES- β Ls) in the developed world. J. Travel. Med. 24, 44-51.
- DUTOUR C., R. BONNET, H. MARCHANDIN, M. BOYER, C. CHANAL, D. SIROT, J. SIROT (2002): CTX-M-1, CTX-M-3, and CTX-M-14 β -Lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 534-537.
- GNIADKOWSKY, M. (2001): Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ES- β Ls) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect. 7, 597-608.
- GUNDRAN, R. S., P. A. CARDENIO, M. A. VILLANUEVA, F. B. SISON, C. C. BENIGNO, K. KREAUSSON, D. PICHPOL, V. PUNYAPORNWITHAYA (2019): Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Vet. Res. 15, 1-8.
- HUJER, A. M., K. M. HUJER, R. A. BONOMO (2001): Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance. Biochim. Biophys. Acta 1547, 37-50.
- KLIEBE, C., B. NIES, J. F. MAYER, R. M. TOLXDORFF-NEUZLING, B. WIEDEMAN (1985): Evolution of plasmid encoded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 28, 302-307.
- KOMPES, G. (2010): Nalaz *bla*_{TEM} i *bla*_{SHV} plazmidnih gena kod fenotipski rezistentnih enterotoksigenih sojeva *E. coli* prema β -laktamskim antibioticima. Disertacija, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- LIAKOPOULOS, A., D. MEVIUS, D. CECCARELLI (2016): A Review of SHV Extended- Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front. Microbiol. 7, 1-27.
- LIVERMORE, D.M. (1995): β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 8, 557-584.
- MAZZARIOL, A., A. BAZAJ, G. CORNAGLIA (2017): Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. J. Chem. 29, 2-9.
- MUGNIER, P., P. DUBROUS, I. CASIN, G. ARLET, E. COLLATZ (1996): A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2488-2493.
- NOBREGA, D. B., M. BROCCCHI (2014): An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. J. Infect. Dev. Ctries. 8, 954-960.
- PATTERSON, D. L., R. A. BONOMO (2005): Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. Clin. Microbiol. 18, 657-686.
- PHILIPPON A., G. ARLET, G. A. JACOBY (2002): Plasmid-Determined AmpC-Type- β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1-11.
- PINTARIĆ, S., L. ŠPELIĆ, K. ZUBAK NOVAK, L. HADŽIĆ, B. ŠEOL MARTINEC (2017): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Kleb-*

- siella pneumoniae* isolated from dogs. Book of Abstracts of the 7th International Congress Veterinary Science and Profession, 5-7 October. Zagreb, Hrvatska. str. 56-56.
- POIREL, L., D. GIRLICH, T. NAAS, P. NORDMANN (2001): OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 447-453.
 - POIREL, L., M. GNIADKOWSKI, P. NORDMANN (2002): Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 1031-1034.
 - PRINARAKIS, E. E., V. MIRIAGOU, E. TZELEPI, M. GAZOULI, and L. S. TZOUVELEKIS (1997): Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 838-840.
 - QUEENAN, A. M., K. BUSH (2007): Carbapenemases: the versatile- β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 440-458.
 - RAMOS, S., V. SILVA, M. L. ENES DAPKEVICIUS, M. CANICA, M. T. TEJEDOR-
 - JUNCO, G. IGREJAS, P. POETA (2020): *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production. *Animals.* 10, 1-15.
 - SAMAHA- KFOURY, J. N., G.F. ARAY (2003): Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *BMJ* 327, 1209-1213.
 - SHAIKH, S., F. JAMALE, S. SHAKIL, S. MOHD, D. RIZVI, M. A. KAMAL (2015): Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 90-101.
 - SOUGAKOFF, W., S. GOUSSARD, P. COURVALIN (1988): The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 343-348.
 - THOMSON, K. S., C. C. SANDERS (1992): Detection of extended-spectrum β -lactamases in the members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1877-1882.
 - THOMSON, K. S. (2001): Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta Lactamases. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 333-336.
 - VALENTIN, L., H. SHARP, K. HILLE, U. SEIBT, J. FISCHER, Y. PFEIFER, G. BRENNER MICHAEL, S. NICKEL, J. SCHMIEDEL, L. FALGENHAUER, A. FRIESE, R. BAUERFEIND, U. ROESLER, C. IMIRZALIOGLU, T. CHAKRABORTY, R. HELMUTH, G. VALENZA, G. WERNER, S. SCHWARZ, B. GUERRA, B. APPEL, L. KREIENBROCK, A. KÄSBOHRER (2014): Subgrouping of ESBL-producing *E. coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 805-816.

19TH INTERNATIONAL EXHIBITION OF PRODUCTS AND ACCESSORIES FOR PETSLET'S MEET
AT ZOOMARK

#in person

SAVE THE DATE

10.11 > 12.11 2021

