

# Metalo- $\beta$ -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike

---

Sardelić, Sanda

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:376705>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Sardelić, Sanda (2010) *Metalo- $\beta$ -laktamaze u kliničkih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike [Metalo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.***

<http://medlib.mef.hr/859>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Sanda Sardelić**

**Metallo- $\beta$ -laktamaze u kliničkih sojeva  
*Pseudomonas aeruginosa*  
otpornih na karbapenemske antibiotike**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2010.

Rad je izrađen u Odjelu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split, Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu i Odjelu za molekularnu mikrobiologiju Sveučilišne bolnice "Le Scotte" u Sieni, Italija.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Branka Bedenić

## **Zahvala**

*Od srca zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. Branki Bedenić na strpljenju, mudrim savjetima, uloženom trudu, utrošenom vremenu i nesebičnoj pomoći pri izradi i pisanju ovog rada.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, posebice predstojnici Zavoda prof.dr. Smilji Kalenić što je uvijek imala razumijevanja i riječi ohrabrenja te što je omogućila izradu većeg dijela praktičnog rada u svom Zavodu, dipl. ing. Stjepanu Katiću i lab. tehn. Dubravku Šijku na velikom trudu i svesrdnoj pomoći u izradi disertacije, dr. Zrinki Bošnjak na pomoći, doc. Stipi Orhanoviću s PMF-a Split na utrošenom vremenu i pomoći te osoblju Odjela za molekularnu mikrobiologiju bolnice "Le Scotte" i posebno prof. dr. Gian Maria Rossolinu i prof. dr. Jean Denis Doquieru na ukazanoj gostoljubivosti i pomoći. Veliko hvala mojoj dragoj prijateljici Celine Colinon na strpljenju, savjetima i pomoći. Zahvala lab. tehničarima i kolegicama s mog Odjela na pomoći oko prikupljanja zbirke sojeva, posebice lab. tehničarki č. sr. Nedjeljki Perković-Tabak na velikom strpljenju i pomoći u radu. Posebno hvala ing. Vesni Čapkun na pomoći.*

*Zahvaljujem mojoj obitelji, posebice mojoj majci te mojim najdražim curama Eni i Lindi na strpljenju i ljubavi.*

*Ovu disertaciju posvećujem mom ocu, koji bi, vjerujem, bio jako ponosan.*

Sanda

**Popis kratica**

**ESBL** -  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra

**PBP** - penicilin vežući protein

**MBL** - metalo- $\beta$ -laktamaza

**EDTA** - etilen diamin tetraoctena kiselina

**MIK** - minimalna inhibicijska koncentracija

**PCR** - lančana reakcija polimeraze

**RAPD** - nasumično umnožena polimorfna DNA

**RFLP** - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

**MLST** - tipizacija na osnovi multilokusnih sekvenci

**MLEE** - enzimatska elektroforeza multi-lokusa

**PFGE** - elektroforeza u pulzirajućem polju

**SDS-PAGE** - elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrij-dodecil sulfata

**CS** - konzervirani segment

**IR** - obrnuta ponavljanja

**IS** - umetnuta sekvenca

**ORF** - otvoreni okvir čitanja

**DNK** - deoksiribonukleinska kiselina

**bp** - parovi baza

**Tn** - transposon

## SADRŽAJ

<b>1 UVOD</b> .....	<b>8</b>
1.1 ZNAČAJ IZOLACIJE PSEUDOMONAS AERUGINOSA IZ KLINIČKIH UZORAKA.....	8
1.2 LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	9
1.3 MEHANIZMI OTPORNOSTI PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA ANTIBIOTIKE.....	10
1.3.1 UROĐENA OTPORNOST.....	10
1.3.2 STEČENA OTPORNOST.....	13
1.3.2.1 STEČENE $\beta$ -LAKTAMAZE.....	13
1.4 OTPORNOST PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA KARBAPENEMSKJE ANTIBIOTIKE POSREDOVANA.....	15
METALO-BETA-LAKTAMAZAMA (MBL).....	15
1.4.1 SUPSTRATNI PROFIL I UČINKOVITOST STEČENIH MBL.....	17
1.4.2 ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST STEČENIH MBL.....	20
1.5 OTPORNOST PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA KARBAPENEMSKJE ANTIBIOTIKE KOJA NIJE POSREDOVANA MBL.....	26
1.5.1 KARBAPENEMAZE KOJE NISU MBL.....	26
1.5.2 PROMJENE VANJSKE MEMBRANE.....	27
1.6 SMJEŠTAJ I NAČIN PRIJENOSA GENA KOJI KODIRAJU MBL.....	27
1.7 KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ MBL.....	33
1.8 LABORATORIJSKE METODE DETEKCIJE MBL I TIPIZACIJE IZOLATA.....	35
1.9 NEODGOVORENA PITANJA U DOSADAŠNJIM ISTRAŽIVANJIMA.....	38
<b>2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>40</b>
2.1 OPĆI CILJ ISTRAŽIVANJA.....	40
2.2 SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	40
<b>3 HIPOTEZA</b> .....	<b>41</b>
<b>4 MATERIJAL</b> .....	<b>41</b>
4.1 IZOLATI PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	41
4.2 KLINIČKI PODATCI BOLESNIKA.....	43
<b>5 METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>43</b>
5.1 IDENTIFIKACIJA IZOLATA.....	43
5.2 MEDIJI UZGOJA.....	44
5.3 SEROTIPIZACIJA.....	44
5.4 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE.....	45
5.4.1 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE DISK DIFUZIJSKOM METODOM.....	45
5.4.2 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE DILUCIJSKOM METODOM.....	45
5.5 REZISTOTIPIZACIJA.....	46
5.6 METODE FENOTIPSKJE DETEKCIJE MBL.....	48
5.6.1 EPI (EDTA-PHENANTROLIN-IMPENEM) MIKRODILUCIJSKA METODA.....	48
5.6.2 E-TEST MBL.....	48
5.7 METODE FENOTIPSKJE DETEKCIJE OSTALIH BETA-LAKTAMAZA.....	49
5.7.1 DISK DIFUZIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE KISELINE I KLAVULANSKE KISELINE.....	49

5.7.2 MIKRODILUCIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE KISELINE I KLAVULANSKE KISELINE.....	50
5.8 FENOTIPSKU METODU DETEKCIJE POJAČANOG RADA EFLUKSNIH CRPKI .....	50
5.9 ENZIMATSKI ESEJI IZ STANIČNIH EKSTRAKATA.....	51
- AKTIVNOST MBL .....	51
5.10 DETEKCIJA OPRD PROTEINA VANJSKE MEMBRANE.....	51
5.11 METODE DETEKCIJE GENA ZA MBL .....	53
5.11.1 EKSTRAKCIJA DNK.....	53
5.11.2 PROBIRNE PCR REAKCIJE.....	53
5.11.3 AMPLIFIKACIJA INTEGRONA .....	54
5.12 GENOTIPIZACIJA IZOLATA .....	56
5.12.1 ELEKTROFOREZA U PULZIRAJUĆEM POLJU.....	56
5.12.2 RAPD - POLIMORFIZAM NASUMCE UMNOŽENE DNK.....	57
5.13 DETEKCIJA SMJEŠTAJA GENA ZA MBL.....	58
5.13.1 ODREĐIVANJE LOKALIZACIJE <i>bla<sub>VIM</sub></i> GENA .....	58
5.14 SEKVENCIRANJE.....	59
5.15 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	59
<b>6 REZULTATI.....</b>	<b>60</b>
6.1 ZBIRKA IZOLATA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	60
6.2 OPĆE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA KOJIMA SU PRIPADALI IZOLATI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	61
6.3 SEROTIPIZACIJA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	64
6.4 OSJETLJIVOST <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> NA ANTIBIOTIKE.....	66
6.5 USPOREDBA REZULTATA TESTIRANJA OSJETLJIVOSTI <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> RAZLIČITIM LABORATORIJSKIM METODAMA .....	68
6.5.1 KORELACIJA DISK DIFUZIJSKE I MIKRODILUCIJSKE METODE.....	68
6.5.2 PODUDARNOST DISK DIFUZIJSKE I MIKRODILUCIJSKE METODE .....	70
6.6 REZISTOTIPIZACIJA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	71
6.7 FENOTIPSKU DETEKCIJU MBL .....	75
6.7.1 EPI MIKRODILUCIJSKA METODA.....	75
6.7.2 E-TEST MBL.....	75
6.8 FENOTIPSKU DETEKCIJU OSTALIH BETA-LAKTAMAZA .....	77
6.8.1 DISK DIFUZIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE I KLAVULANSKE KISELINE.....	77
6.8.2 MIKRODILUCIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE I KLAVULANSKE KISELINE.....	81
6.9 FENOTIPSKU DETEKCIJU POJAČANOG RADA EFLUKSNIH CRPKI .....	81
6.10 ENZIMATSKI ESEJI IZ STANIČNIH EKSTRAKATA.....	84
6.10.1 ISPITIVANJE AKTIVNOSTI MBL (HIDROLIZA IMIPENEMA) .....	84
6.11 DETEKCIJA OPRD PROTEINA VANJSKE MEMBRANE.....	86
6.12 MOLEKULARNE METODE .....	91
6.12.1 AMPLIFIKACIJA GENA ZA MBL (VIM, IMP) .....	91
6.12.2 AMPLIFIKACIJA GENA ZA PROTEIN VANJSKE MEMBRANE OPRD.....	92
6.12.3 AMPLIFIKACIJA GENA ZA $\beta$ -LAKTAMAZU PROŠIRENOG SPEKTRA PER-1.....	93
6.12.4 AMPLIFIKACIJA INTEGRONA ZA VIM-POZITIVNE IZOLATE.....	94
6.13 GENOTIPIZACIJA IZOLATA .....	99
6.13.1 GENOTIPIZACIJA ELEKTROFOREZOM U PULZIRAJUĆEM POLJU.....	99



6.14 DETEKCIJA SMJEŠTAJA GENA ZA MBL.....	110
6.14.1 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNK.....	110
6.14.2 SOUTHERN BLOTING.....	110
6.15 SEKVENCIRANJE.....	112
6.15.1 SEKVENCIRANJE AMPLIKONA PCR REAKCIJE ZA GEN $BLA_{VM}$ .....	112
6.15.2 SEKVENCIRANJE AMPLIKONA PCR REAKCIJA ZA INTEGRON UNUTAR KOJEG JE GEN $BLA_{VM}$ .....	114
6.16 USPOREDBA MBL POZITIVNIH IZOLATA.....	117
6.17 PROVJERA IDENTIFIKACIJE VRSTE ZA MBL POZITIVNE IZOLATE.....	123
6.18 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA O BOLESNICIMA S ANKETNOG LISTIČA S OBZIROM NA DULJINU HOSPITALIZACIJE I ISHOD .....	124
<b>7 RASPRAVA .....</b>	<b>129</b>
<b>8 ZAKLJUČCI .....</b>	<b>164</b>
<b>9 SAŽETAK.....</b>	<b>166</b>
<b>10 SUMMARY .....</b>	<b>168</b>
<b>10 LITERATURA .....</b>	<b>170</b>
<b>12 ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>209</b>

## 1 UVOD

### 1.1 ZNAČAJ IZOLACIJE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IZ KLINIČKIH UZORAKA

*Pseudomonas aeruginosa* je ubikvitarni, slobodno-živići Gram negativan aeroban bacil koji često uzrokuje infekcije u hospitaliziranih bolesnika, posebice onih u jedinicama intenzivne njege.<sup>1-2</sup> Rijetko je dio fiziološke flore, ali u bolničkom okruženju vrlo brzo kolonizira kožu i sluznice bolesnika te se može izolirati i iz hrane, umivaonika, slavina, sredstava za čišćenje, dezinficijensa te uređaja za umjetnu respiraciju.<sup>3-5</sup> Širi se od bolesnika do bolesnika preko ruku osoblja, kontaminiranim predmetima, ovlaživačima zraka u bolesnika na umjetnoj ventilaciji te rjeđe ingestijom kontaminirane vode ili hrane.<sup>5,6</sup> Može uzrokovati infekcije gotovo svakog tkiva.<sup>7-10</sup> Lokalizirane infekcije kirurške rane ili opekotine često imaju za posljedicu visokosmrtnu bakterijemiju. Infekcije urinarnog trakta povezane su najčešće s uporabom katetera ili sredstava za ispiranje mokraćnog mjehura. Bolesnici s cističnom fibrozom redovito su kolonizirani ovom bakterijom, a najčešće i umiru od lokalizirane pseudomonasne infekcije pluća. Nozokomijalne pseudomonasne infekcije respiratornog sustava javljaju se u intubiranih bolesnika na kontaminiranim respiratorima. Nakon ozljede ili kirurgije oka, može doći do teškog pseudomonasnog keratitisa. U čistoj kulturi može se naći u djece s upalom srednjeg, a u odraslih s upalom vanjskog uha. Rijedak je uzročnik meningitisa nakon lumbalne punkcije ili endokarditisa nakon operacija na srcu. Od ukupnog broja bakterijemija, *Pseudomonas*

*aeruginosa* uzrokuje 3-7%.<sup>3</sup> Infekcije mogu ostati lokalizirane ili diseminirati, najčešće u bolesnika s neutropenijom, iatrogenom imunosupresijom ili onih teškog općeg stanja, zbog oslabljenog imunog odgovora domaćina.<sup>11</sup> *Pseudomonas aeruginosa* je pravi oportunistički patogen, što znači da koristi narušen sustav imune obrane domaćina kako bi započeo infekciju.<sup>11-13</sup> Po literaturnim podacima, *Pseudomonas aeruginosa* uzrokuje oko 4 infekcije na 1000 otpusta, a 10% svih nozokomijalnih infekcija.<sup>2,14</sup> Visoka smrtnost povezana s infekcijama koje uzrokuje, a koja se kreće od 10-60% posljedica je kombinacije oslabljenog imunog odgovora domaćina, virulencijskih činitelja bakterije, poglavito vanstaničnih enzima i toksina te otpornosti na antibiotike.<sup>1,12,14-16</sup> U pristupu bolesnika s pseudomonasnom infekcijom odlučujuća je rana i primjerena antimikrobna terapija. Studije su pokazale izravnu korelaciju između otpornosti *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike koji se koriste u empirijskoj terapiji i loše kliničke prognoze.<sup>17-19</sup>

## **1.2 LIJEČENJE INFEKCIJA UZROKOVANIH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Broj antibiotika koji se mogu dati za *Pseudomonas aeruginosa* infekciju ograničen je na antipseudomonasne peniciline (ureido-penicilini i  $\alpha$ -karboksipenicilini: piperacilin, karbenicilin), cefalosporine III. i IV. generacije (ceftazidim, cefoperazon i cefepim), monobaktame (aztreonam), fluorokinolone (norfloksacin, ciprofloksacin, levofloksacin) te karbapeneme (imipenem, meropenem, doripenem).<sup>17,18,20</sup> Aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin, netilmicin, amikacin) se ne preporučuju u monoterapiji već kao dio kombinirane terapije u liječenju teških pseudomonasnih infekcija.<sup>20,21</sup> Polimiksini (polimiksin B, E) su povijesno povezani s dobrim učinkom na pseudomonase, ali su se zbog toksičnosti i brzog

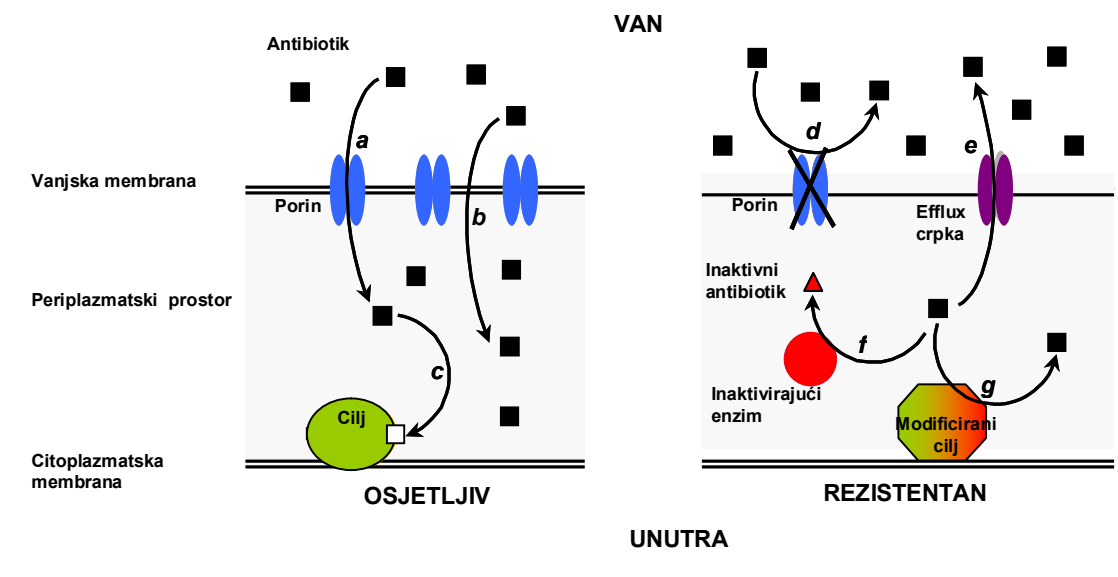
razvoja rezistencije povukli iz kliničke primjene no posljednjih godina ponovo se koriste upravo u liječenju infekcija uzrokovanih multiplo-rezistentnim *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>22,23</sup>

### **1.3 MEHANIZMI OTPORNOSTI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA ANTIBIOTIKE**

Da bi antibiotik bio djelotvoran, on mora doći do ciljnog mjesta svojeg djelovanja, stupiti u interakciju s tim ciljnim mjestom i uspješno inhibirati funkciju tog ciljnog mjesta. Primjerice, rezistencija na  $\beta$ -laktame u *P. aeruginosa* posljedica je nekoliko različitih mehanizama uz pomoć kojeg se bakterija uspješno suprotstavlja učinku antibiotika.<sup>24</sup> Međuigra ovih mehanizama može bakteriju učiniti potpuno rezistentnom na sve  $\beta$ -laktame, kao što prikazuje slika 1.

#### **1.3.1 UROĐENA OTPORNOST**

Urođena otpornost obično je izražena u svih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* koji su zbog nje manje osjetljivi na antibiotike u usporedbi s enterobakterijama. Ona je posljedica prisutnosti kromosomske AmpC  $\beta$ -laktamaze, nepropusnosti stanične membrane te efluksa.<sup>25-27</sup> Zbog navedenog *Pseudomonas aeruginosa* je prirodno otporan na kristalni penicilin, ampicilin, amoksicilin, koamoksiklav, prvu i drugu generaciju cefalosporina, nalidiksnu kiselinu, makrolide, kloramfenikol, tetracikline i trimetoprim.<sup>28</sup>



**Slika 1. Shematski prikaz stanične stijenke *Pseudomonas aeruginosa* i različitih mehanizama rezistencije na  $\beta$ -laktame.**

Antibiotik ulazi u bakterijsku stanicu preko specifičnih porina (a) ili pasivnom difuzijom (b) i inaktivira svoj cilj (c). Rezistencija može biti rezultat promjena unutar vanjske membrane - smanjenim stvaranjem porina (d) ili pojačanim radom efluksne crpke (e), stvaranjem inaktivirajućih enzima (f) odnosno modifikacijom ciljnog mjesta (g) ili međuigrom više nabrojenih mehanizama.

Urođenu  $\beta$ -laktamsku rezistenciju *Pseudomonas aeruginosa* posreduje kromosomska  $\beta$ -laktamaza koja pripada klasi C po Ambleru, odnosno grupi 1 po Bushovoj.<sup>29,30</sup> Osim kromosomske AmpC  $\beta$ -laktamaze *P. aeruginosa* posjeduje i kromosomska  $\beta$ -laktamazu iz klase D, OXA-50, iako ova posljednja malo pridonosi rezistenciji.<sup>31</sup> Hidrolizi enzimom AmpC podložni su ampicilin i cefalosporini uskog spektra budući da oni jako induciraju enzim, dok su ureidopenicilini i cefalosporini proširenog spektra slabi induktori, ali aktivni na inducibilne

sojeve te inaktivni na dereprimirane. Karbapenemi, iako dobri induktori su ili granično labilni (imipenem) ili učinkovito stabilni (meropenem) pa ostaju djelotvorni bez obzira na način ekspresije  $\beta$ -laktamaze. U nedostatku induktora, aktivnost AmpC  $\beta$ -laktamaze poprima bazalne vrijednosti. U slučaju mutacije regulatornih gena, i to najčešće *ampD*,  $\beta$ -laktamaza AmpC postaje dereprimirana bilo parcijalno, što je češće, ili trajno, s posljedičnom stabilnom rezistencijom na oksiiinocefalosporine.

Male hidrofilne molekule poput  $\beta$ -laktama i fluoriranih kinolona prolaze vanjsku membranu pseudomonasa kroz vodene kanale koje okružuju porinski proteini. Većina porina oblikuju trimere koji se protežu preko cijele širine vanjske membrane. Iako je porin oprF najčešće prisutan, mutante bez ovog porina ne pokazuju rezistenciju na antibiotike, dok međutim oprD, porin povezan s preuzimanjem pozitivno nabijenih aminokiselina, predstavlja i mjesto prolaza imipenema pa mutante bez oprD proteina pokazuju rezistenciju na imipenem s povećanjem MIK-a za imipenem na 8-32  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>26,27,32</sup> Ovaj kanal ne koristi meropenem pri prolasku vanjske membrane. Veliki broj gena u pseudomonasa uključen je u sisteme aktivnog efluksa, odnosno izbacivanja antibiotika te niza drugih kemijskih tvari (biocidi, boje, detergentski, organska otapala) iz bakterijske stanice.<sup>33,34</sup> Ovaj mehanizam rezistencije uvelike objašnjava prirodnu otpornost pseudomonasa na niz antibiotika. Za sada se čini da genom kodira 10-12 efluksnih sustava od koji su najpoznatiji MexAB-oprM, MexXY-oprM, MexCD-oprJ, MexEF-oprN i MexJK-oprM.<sup>26,34</sup>

Radi se o transmembranskim sustavima s tri proteina od kojih je jedan lociran u citoplazmi i djeluje na principu o energiji ovisne crpke (Mex), drugi koji se nalazi na vanjskoj membrani - odnosno porin (Opr) i protein koji povezuje opisana dva. Iako su geni koji kodiraju ove proteine prisutni u genomu pseudomonasa, mutacijom regulatornih gena može doći do pojačane

ekspresije i pojačanog rada crpki s aktivnim izbacivanjem niza antibiotika, ovisno o supstratima pojedine crpke. Najpoznatija crpka - MexAB sustav izbacuje aktivno  $\beta$ -laktame (karbenicilin, piperacilin, ceftazidim, cefepim, aztreonam, meropenem; dakle samo je imipenem pošteđen),  $\beta$ -laktamaza inhibitore, fluorokinolone, kloramfenikol, makrolide, trimetoprim, tetracikline. Imipenem nije zahvaćen ovim efluksnim sustavom vjerojatno zbog hidrofobnog postraničnog lanca kojeg ima meropenem, a koji nedostaje imipenemu. Mutacije koje dovode do pojačanog rada crpke mogu nastati tijekom terapije fluorokinolonima i cefalosporinima.<sup>35</sup> MexCD eksportira  $\beta$ -laktame (posebice cefepim i cefpirom), fluorokinolone, kloramfenikol, tetracikline, makrolide; MexEF fluorokinolone, kloramfenikol, trimetoprim - ova crpka pri mutaciji (tzv. *nfxC* *mexT* lokusa) posreduju rezistenciju i na imipenem budući da je povezana sa smanjenom ekspresijom *oprD* proteina. MexXY crpka izbacuje aktivno fluorokinolone, aminoglikozide, tetracikline i makrolide te usko povezana s *oprM* pridonosi također intrinzičnoj rezistenciji pseudomonasa.

Promjena ciljne molekule, odnosno PBP-a nije mehanizam rezistencije tipičan za pseudomonasa i  $\beta$ -laktame; postoje međutim izvješća o promjenama PBP-5 koje se povezuju s intrinzičkom rezistencijom na  $\beta$ -laktame, kao i stečene rezistencije na imipenem povezane s ekspresijom PBP-4 sa smanjenim afinitetom na imipenem.<sup>36,37</sup>

### **1.3.2 STEČENA OTPORNOST**

#### **1.3.2.1 STEČENE $\beta$ -LAKTAMAZE**

Stečene  $\beta$ -laktamaze su u *P. aeruginosa* rijetke. Primjerice u studiji u Velikoj Britaniji provedenoj na gotovo dvije tisuće izolata, učestalost sekundarnih  $\beta$ -laktamaza bila je 0,7%.<sup>38</sup>

Iz molekularne klase A po Ambleru, u pseudomonasa su dominantne PSE-1 (CARB-2) i PSE-4 (CARB-1)  $\beta$ -laktamaze, iako se opisuju i CARB-3 i CARB-4.<sup>39</sup> Hidroliziraju karboksipeniciline i ureidopeniciline. U istoj klasi u *P. aeruginosa* opisane su  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra čija je aktivnost *in vitro* inhibirana klavulanskom kiselinom i tazobaktamom. Po preporuci nove terminologije u *P. aeruginosa* ovi se enzimi svrstavaju u klasu ESBL<sub>A</sub>, od kojih su nešto češći enzimi tipa TEM (4, 21, 24, 42), SHV (2a, 5, 12), PER-1 i VEB (1, 1a, 1b), dok su GES/IBC (1, 2, 5, 8, 9) te BEL-1 nešto rjeđe.<sup>40,41</sup> Hidrolitički profil im je vrlo sličan budući da su im supstrat osim penicilina uskog spektra, cefalosporini proširenog spektra (3. i 4. generacija) i aztreonam.<sup>42-44</sup> Iznimka je GES-2,  $\beta$ -laktamaza nastala točkastom mutacijom gena za GES-1 s proširenim spektrom djelovanja koji uključuje i imipenem.<sup>45</sup> U rutinskom laboratorijskom radu teško se detektiraju fenomenima sinergije dvostrukog diska zbog istovremene prisutnosti AmpC  $\beta$ -laktamaze.

U molekularnoj klasi D nalaze se oksacilinaze, i to klasične oksacilinaze (OXA-1, -2 i -10) koje posreduju rezistenciju na karboksipeniciline i ureidopeniciline.<sup>46</sup> Ceftazidim, cefepim, cefpirom i aztreonam supstrati su oksacilinaza proširenog spektra, koje se po preporuci za novu terminologiju nazivaju "miješane ESBL" odnosno ESBL<sub>M</sub>, dok se oznaka molekularne klase D dodaje oznaci "M" pa su ESBL koje pripadaju molekularnoj klasi D nazvane ESBL<sub>M-D</sub>.<sup>41</sup> Uobičajeno se oksacilinaze u pseudomonasa svrstavaju u 5 različitih grupa (I-V).<sup>47</sup> U grupi I nalazi se OXA-5, -7 i -10 s ESBL derivatima OXA-11, -14, -16, -17 te OXA-13 s ESBL derivatima OXA-19 i OXA-28. Većina ih hidrolizira ceftazidim bolje od cefepima. Druga grupa uključuje OXA-2, -3, -15 (varijanta OXA-2 koja je ESBL) i -20. Grupa III uključuje OXA-1 i derivate (-4, -30 i -31), grupa IV OXA-9 te grupa V LCR-1.



Osim derivata OXA-2, većina ESBL OXA enzima derivati su oksacilinaze OXA-10. Izolirano se još opisuju oksacilinaze proširenog spektra OXA-18 i OXA-45, također iz multirezistentnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* od kojih je OXA-18 inhibirana klavulanskom kiselinom, dok ostale oksacilinaze nisu inhibirane klavulanatom ni tazobaktamom što otežava njihovu identifikaciju u rutinskom laboratorijskom radu.<sup>48</sup>

#### **1.4 OTPORNOST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA KARBA-PENEMSKJE ANTIBIOTIKE POSREDOVANA METALO- $\beta$ -LAKTAMAZAMA (MBL)**

Od 90-ih godina prošlog stoljeća intenzivnije se pojavljuju izvješća o pojavi nove vrste stečene  $\beta$ -laktamaze među kliničkim izolatima *Pseudomonas aeruginosa* koja može hidrolizirati i karbapeneme, tzv. metalo- $\beta$ -laktamaze.<sup>49,50</sup>

MBL su klinički najznačajnije karbapenemaze, a pripadaju grupi 3  $\beta$ -laktamaza po originalnoj shemi Bushove iz 1989. godine s obzirom na supstratni profil, osjetljivosti na inhibiciju divalentnim ionskim kelatorima, poput EDTA te neučinkovitost serinskih inhibitora  $\beta$ -laktamaza (klavulanske kiseline, tazobaktama).<sup>30,51-53</sup> Osnovne značajke metalo- $\beta$ -laktamaza naspram ostalim serinskim  $\beta$ -laktamazama prikazuje Tablica 1.

Metallo- $\beta$ -laktamaze, kao i sve  $\beta$ -laktamaze, mogu se podijeliti u one koje su kromosomski kodirane i posreduju intrinzičku rezistenciju na karbapeneme, kao npr. one u *Bacillus cereus* ili *Stenotrophomonas maltophilia*, koje se nalaze u svim trima podklasama - B1, B2 i B3, ali i one stečene, odnosno prenosive uz pomoć plazmida, integrona ili transposona, kakve se javljaju u *Pseudomonas aeruginosa* i drugih bakterija, koje se najčešće nalaze u podklasi B1.<sup>53-60</sup>

Tablica 2 donosi pregled najčešćih metalo- $\beta$ -laktamaza, njihovih kratica, mikroorganizama domaćina i osnovnih karakteristika.

**Tablica 1. Usporedba serinskih i metalo- $\beta$ -laktamaza.**

Karakteristike	Serinske- $\beta$ -laktamaze	Metallo- $\beta$ -laktamaze
Strukturna klasifikacija <sup>a</sup>	Klasa A, C i D	Klasa B
Funkcijska klasifikacija <sup>b</sup>	Grupa 1, 2 i 4	Grupa 3
Metalni kofaktor	NE	DA
Osjetljivost na EDTA	NE	DA
Hidroliza karbapenema	NE <sup>c</sup>	DA
Osjetljivost na inhibitore ser. $\beta$ -laktamaza	DA <sup>d</sup>	NE
Reakcijski međuproizvod	acil-enzim	nepoznat <sup>e</sup>

<sup>a</sup> po Ambleru, 1980<sup>29</sup>

<sup>b</sup> po Bush i sur. 1995<sup>30</sup>

<sup>c</sup> uglavnom točno. Nedavno su opisane rijetke karbapenemaze (npr. GES)<sup>39</sup>, u kojih su karbapenemi samo prošireni supstratni profil. Katalitička učinkovitost im je uvijek niža od one u MBL.

<sup>d</sup> klasa C enzima slabo su inaktivirani inhibitorima.

<sup>e</sup> još uvijek nema eksperimentalnih dokaza o međuprojektu.

Na molekularnoj razini metalo- $\beta$ -laktamaze *Pseudomonas aeruginosa* nalaze se u Amblerovoj podklasi B1, a pripadaju joj MBL tipa IMP, VIM, GIM i SPM.<sup>52,61</sup> Nedavno je opisana i nova MBL, nazvana AIM-1 u *P. aeruginosa* iz Australije<sup>62</sup>, za sada je nukleotidni slijed prijavljen PubMed bazi podataka pod brojem AM998375. Ove se podklase mogu razlikovati i po tzv.

BBL brojevnoj shemi koja je nedavno revidirana,<sup>63</sup> a koja se temelji na strukturnim svojstvima uključujući i organizaciju mjesta vezanja metalnog iona. Naime, sveukupna geometrija tog dijela poprilično je konzervirana, ali se upravo razlikuje priroda rezidua koje sudjeluju u organizaciji mjesta vezanja cinkovog iona. Tako u podklasi B1 imamo na poziciji 116 histidin (uz poziciju 118, 196 i 263), dok je u podklasi B2 na tom mjestu asparagin, odnosno u B3 glutamin, dok primjerice u podklasi B3 nedostaje na mjestu 221 cistein, a nadomješta ga histidin na poziciji 121. Razlike redoslijeda aminokiselina između pojedinih podgrupa prikazuje Slika 2.

#### **1.4.1 SUPSTRATNI PROFIL I UČINKOVITOST STEČENIH MBL**

MBL tipa IMP, VIM, GIM i SPM imaju vrlo širok profil supstrata, koji uključuje sve  $\beta$ -laktame, pa tako i karbapeneme (zato se i nazivaju karbapenemaze). Iako im je struktura aktivnog mjesta i uzvojnica vrlo slična, njihova sposobnost vezanja i hidrolize  $\beta$ -laktama izrazito varira, čak i unutar iste vrste enzima. Najočitiiji primjer je razlika enzima VIM-1 i VIM-2 koji se razlikuju u nekih 25 aminokiselina, ali im je enzimska kinetika potpuno različita.  $K_m$  označava afinitet enzima za supstrat,  $K_{cat}$  je katalitička sposobnost enzima dok je odnos te dvije jedinice mjerilo sveukupne enzimске katalitičke učinkovitosti. VIM-1 učinkovitije hidrolizira većinu  $\beta$ -laktama (piperacilin, azlocilin, tikarcilin, cefotaksim, ceftazidim, cepirom i meropenem) od VIM-2 s izuzetkom imipenema gdje VIM-1 i VIM-2 imaju  $K_{cat}$  vrijednosti od 0,2  $\mu\text{M/s}$  odnosno 34  $\mu\text{M/s}$ , vjerojatno zbog razlika u aminokiselinskom sastavu u blizini aktivnog mjesta.<sup>64</sup>

**Tablica 2. Geni za metalo- $\beta$ -laktamaze različitih podvrsta i njihova distribucija među mikroorganizmima.<sup>61\*</sup>**

Pod-razred	Kratika enzima	Varijante	Bakterija domaćin	Klinički značaj <sup>b</sup>	Porijeklo	Inducibilna	IPM <sup>c</sup> MIK (µg/mL)
B1	BC-II	>6	<i>Bacillus cereus</i>	-	Prirodna	NE	n.p. <sup>d</sup>
	Bla2	>1	<i>Bacillus anthracis</i>	+	Prirodna	NE	n.p.
	Bce 170	>1	Alkalophylic <i>Bacillus</i> spp.	+/-	Prirodna	n.p.	n.p.
	BlaB	>11	<i>Elisabethkingia meningoseptica</i>	++	Prirodna	NE	32
	ccrA (CfiA)	>10	<i>Bacteroides fragilis</i>	++	Prirodna/Stečena	NE	>8
	CGB-1	>1	<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	Prirodna	NE	2
	EBR-1	>1	<i>Empedobacter brevis</i>	+	Prirodna	NE	8
	GIM-1	>1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	Stečena	NE	>8
	IMP	>18	Gram-negativni fermentori i nonfermentori	+++	Stečena	NE	2 – 256
	IND	>5	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	+	Prirodna	NE	32
	JOHN-1	>1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	-	Prirodna	n.p.	2
	MUS-1	>1	<i>Myroides odoratimimus</i>	+	Prirodna	NE	8
	SPM-1	>1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	Stečena	NE	256 ?
	TUS-1	>1	<i>Myroides odoratus</i>	+	Prirodna	NE	4
	VIM	>11	Gram-negativni fermentori i nonfermentori	+++	Stečena	NE	2 – 256
	B2	AsbM1	>1	<i>Aeromonas veronii</i>	++	Prirodna	DA
CphA (ImiS)		>3	<i>Aeromonas hydrophila</i> (veronii)	++	Prirodna	DA	4 - >128
CVI		>1	<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	Prirodna	n.p.	n.p.
Sfh-1		>1	<i>Serratia fonticola</i>	-	Prirodna	n.p.	32
B3	CAU-1 (Mbl1B)	>2	<i>Caulobacter crescentus</i>	-	Prirodna	NE	4
	FEZ-1	>1	<i>Legionella gormanii</i>	++	Prirodna	NE	n.p.
	GOB	>8	<i>Elisabethkingia meningoseptica</i>	++	Prirodna	NE	32
	L1	>11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	++	Prirodna/Stečena	DA	64 - >256
	NEV	>1	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	-	Prirodna	n.p.	n.p.
	THIN-B	>1	<i>Janthinobacter lividum</i>	-	Prirodna	n.p.	n.p.

\*Nisu navedene sve MBL. <sup>b</sup> klinički neznačajne bakterijske vrste; + bakterijske vrste rijeko prisutne u bolničkom okruženju; ++ bakterijske vrste nešto češće prisutne u bolničkom okruženju; +++ glavni oportunistički patogeni, prisutni u preko 50% izolata <sup>c</sup>IPM - imipenem <sup>d</sup>n.p. nije poznato

	1		50		100	110								
		S1	S2	L1	S3	S4	H1							
BcII		SQK	VEKTVIKNET	GTISTISQLMK	NVWVHTELSG	FNG	EAVPSN	GLVINTSKGL	VLVDSNDK	LTRELIEMVE	KRFQ	KRVT		
IMP-1		AESL	PDLKIEKLE	GVVHTSEFE	VNGGVVVKH	GLVVLVNAEA	YLIDTPPTAK	DTEKLVNWFV	ERGY	..	..	..		
CcrA		AQKSVKIS	DDISTIQLESD	NVITYVSLAE	IEGNGVPSN	GHIVVNHQA	ALLDTPINDA	QTEKLVNWFV	DSLH	..	..	..		
VIM-2		EYPTVSEIPV	GEVRLYQLAD	GVVSHIATQS	FDG	AVYPSN	GLIVRDSDEL	LLIDTAMGAK	WTAALLAEIE	KQIG	..	..		
BlaB		QEN	PDWKIEKLEK	NLYVYTYTNT	FNG	TKYAAN	AVYLVTRKGV	VVIDCPAGED	KKSPFDEIY	KKHG	..	..		
B2 CphA		AGMSLTVQVSG	PVYVVEDNYY	.....	VQEN	SMVYFGARGV	TVVGTATWPD	TARELNKLIK	RVS	..	..	..		
L1		EVPLPQL	RAYTVDASWL	QPMAPLQIAD	HTWQIGT	.....	EDLT	ALLVQTPDGA	VLLDGGM	PQ	MASHLLDNMK	ARGVTFRDLR		
B3 FEZ-1		AYPMP	NPFPPFRIG	NLYYVGT	.....	DDLA	SYLVITPRGN	ILINSDLEA	NVEMIKASIK	KLGFKPSDTK				
	111		150	abcd	170		196		218					
	S5	H2	S6	H3	L2	S7	S8	S9	S10					
BcII	DVIITHAHAD	RIGGIKTLKE	RCIKAHSTA	LTAELAKKNG	Y.....	EEP	LGDLOVTNL	KFGNMKVETE	YPGKCHTEDN	IVVWLPQY	.....	NILV		
IMP-1	GSISHPHSD	STGGIEWLNS	RSIPTYASE	LTNELLKKG	K.....	VQAT	NFSFGVNYWL	VKNKIEV	..F	YFGPGHTEPN	VVWLPPE	.....		
CcrA	TFIPNHFGD	CIGGLGLYLR	KGVSQYANQ	MTIDLAKKNG	L.....	PVP	EHGFTDSLTV	SLDGMPLQCY	YLGPGHTEPN	IVVWLPPE	.....	NILF		
VIM-2	RAVSTHSHDD	RVGGVDVLR	AGVATYASP	STRRLAEVGE	N.....	EIPHSLEG	LSSSGDAVRF	GPVEL	..F	YPGAASHTEPN	LVIYVPSA	.....		
BlaB	MNIATHSHDD	RAGGLELYFGK	IGAKTYSTK	MDSILAKEN	K.....	PRA	QYTFDNNKSF	KVKGSEFOVY	YPGKCHTEDN	VVWVPEKE	.....	KVLV		
CphA	EVINTNYHTD	RAGGNAYWKS	IGAKVVSTR	QTRDLMKSDW	AEIVAFTRKGLPEYDLEL	..VLP	NVVHDDGDFL	QESK	..VRAF	YAGPAHTEPDG	IFVYFPE	.....		
L1	LILLSHAHAD	HAGPVAELKR	RTGAKVAANA	ESAVILLARGG	SDDLH	..FG	..DGITYPP	ANA	DRIVMDGEVI	TVGGIVPTAF	F	MAGHTPGS	TAWTWTDRN	GKPVRIAY
FEZ-1	IFVISHAHFD	HAAGSELIKQ	QTKAKYVMD	EDVSVILSGG	KSDPH	..YANDSSTYFTQ	STV	DKVLHDCERV	ELGGTTLTAR	L	TPGHTRGC	TTWIMLEKDH	GKQYQAVI	
		• Z Z +												
	219		254abcd	260		300								
	L3	H4	S11	L4	H5									
BcII	GG	CLVKSTSAKD	LGNVADAY	VNEWSTSIEN	VLKR	..YRNINAVV	FGHGEV	.....	GDKGLL	LETLDELK				
IMP-1	GG	CFIKP	YG	LGNLGDAN	IEANPESAKL	LKSK	..YGRKRVV	PSHSEV	.....	GDASLL	KLTLEQAVKG	LNESKKPSP	SN	
CcrA	GG	CMLDNQATS	IGNISDAD	VTANPRTLDR	VKAK	..PFSARYVV	FGHGDY	.....	GSETEI	EHTKQIVNRY	IESTSKP			
VIM-2	GG	CAIYELSRIS	AGNVADAD	LAENWPTSLR	IQQH	..YPEAQFVI	FGHGLP	.....	GSLLEL	KHTVNVVKAH	TNRSVAE			
BlaB	GG	CIKNSADSKD	LGVIGEAY	VNDWTSVHM	IQQK	..FSGAQYVV	AGHDDW	.....	KDQRSI	QHTLDLINEY	QOKOKASH			
CphA	GN	CILKEK	..LGNLSFAD	VKAYPQTLER	LKAM	..KLPKRTVI	GGHDSPL	.....	HGPELI	DHYEALIKAA	PQS			
L1	AD	SL	..SAPGYQ	LQGNPRYPHL	IEDYRRSFAT	VRAL	..PCDVL	TPHPGASNMD	YAAGAR	..AG	AKALICKAYA	DAAEQKFDGQ	LAKETAGAR	
FEZ-1	IG	SI	..GVNPGYK	LVDNITYPKI	AEDYKHSIKV	LES	..RCDIFL	GSHAGMFDL	NKYVLLQKQNNPF	VDFGTCKNVI	EQKANDFYTE	LKKQETA		
		5												

**Slika 2. Heterogenost aminokiselinskog slijeda različitih MBL-a i BBL brojevna shema.<sup>63</sup>**

Predstavnici za svaku podgrupu su navedeni u usporedbi. Sekvence su nazvane po vrstama MBL-a: BcII, *B. cereus*; IMP-1, *P. aeruginosa*; CcrA, *B. fragilis*; VIM-2, *P. aeruginosa*; BlaB, *E. meningoseptica*; CphA, *Aeromonas hydrophila*; L1, *S. maltophilia*; FEZ-1, *L. gormanii*. BBL brojevna shema je također navedena. Konzervirani dijelovi sekundarnih struktura navedeni su kraticama iznad sekvencija: S - lanac, H - uzvojnica, L - petlja. Aminokiselinske insercije u novootkrivenih enzima prikazane su malim slovima. Ligandi cinka obilježeni su: Z - konzervirani dijelovi u sve tri podgrupe; • - konzervirani dijelovi u B1 i neki u B3; + - konzervirani dijelovi u grupi B3; §, konzervirani dijelovi u podgrupi B1 i B2. L2 i L4 su vrlo varijabilne regije. Istaknuti su dijelovi strukturno konzerviranih redoslijeda.

SPM-1 hidrolizira većinu terapijskih  $\beta$ -laktama dobro i općenito je učinkovitiji od IMP-1 i GIM-1. Izuzetak su ampicilin, imipenem i moksalaktam za IMP-1. SPM-1 također veže dobro i cefalosporine, posebice cefoksitin, čak jače nego peniciline i karbapeneme. GIM-1 funkcionira poglavito kao penicilinaza s umjerenom aktivnosti prema cefalosporinima uskog spektra i karbapenemima, pa osim imipenema, cefepima i moksalaktama, vrlo slabo veže većinu  $\beta$ -laktama.<sup>64-67</sup>

Ni jedan od ovih enzima ne hidrolizira aztreonam, te je logična sugestija bila koristiti aztreonam kao terapijski izbor u infekcijama uzrokovanim bakterijama koje luče MBL. međutim, eksperimentalne studije na životinjama pokazale su da u liječenju pneumonija uzrokovanih *Pseudomonas aeruginosa* koji luči VIM-2, nije bilo moguće eradicirati mikroorganizam ni uz primjenu visokih doza ovog lijeka.<sup>68</sup>

#### **1.4.2 ZEMLJOPISNA PROŠIRENOST STEČENIH MBL**

Dva tipa stečenih metalo- $\beta$ -laktamaza prevladavaju danas u Gram-negativnim bakterijama: IMP- i VIM- s brojnim alelskim varijantama (IMP 1-24, VIM 1-23) (dostupne na: [www.lahey.org/Studies/](http://www.lahey.org/Studies/)).

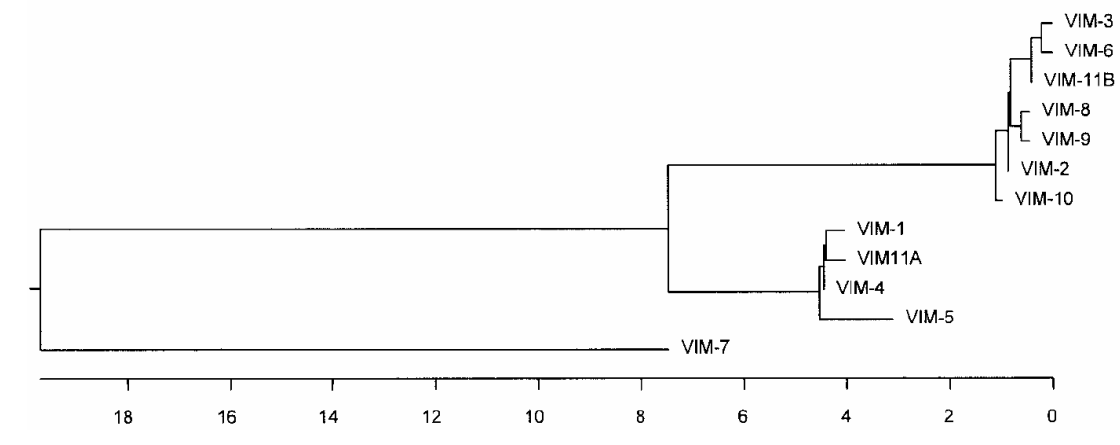
Enzimi IMP ("imipenemase") tipa prvi su puta otkriveni u Japanu u izolatu iz 1988. godine,<sup>49</sup> dok su oni VIM ("Veronese imipenemase") tipa prvi puta otkriveni u Italiji 1997. godine.<sup>50</sup>

Nakon inicijalnog otkrića *bla*<sub>IMP</sub> gena u *Pseudomonas aeruginosa*, uslijedila su i Japanska izvješća o proširenosti metalo- $\beta$ -laktamaze ovog tipa među sojevima i nekih enterobakterija (*S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Providentia rettgeri*) i drugih

nefermentativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis*) uz otkriće novih alelskih varijanti (IMP 3, 6, 10).<sup>61,69</sup> Japanska priča prekinuta je izvješćima iz Europe, i to Italije<sup>70</sup> i Portugala<sup>71</sup>, otkrićem novih IMP varijanti u *Acinetobacter baumannii*. Uslijedili su radovi s opisima metalo- $\beta$ -laktamaza-pozitivnih sojeva postojećih i novih alelskih IMP varijanti u *Pseudomonas aeruginosa*, drugih nefermentativnih bakterija i enterobakterija iz Europe, Kanade, Kine, Australije i Južne Amerike.<sup>61,72-76</sup> Posljednja opisana alelska varijanta, IMP-22 otkrivena je u *Pseudomonas aeruginosa* nozokomijalnog izolata u Italiji, ali i u *P. fluorescens* okolišnog izolata što još jednom potvrđuje hipotezu o okolišnim bakterijama kao izvoru gena za rezistenciju.<sup>77</sup>

MBL iz porodice VIM prvi puta je opisana u izolatu iz 1997. godine (rad je publiciran dvije godine kasnije) u Italiji.<sup>50</sup> Gen *bla*<sub>VIM-1</sub> otkriven je inicijalno u *Pseudomonas aeruginosa*, a zatim u *Achromobacter xylosoxidans* te *Pseudomonas putida*.<sup>50,61</sup> Uslijedila su potom izvješća o njegovom otkriću i u enterobakterija (u Grčkoj: *E. coli*, *K. pneumoniae*, Francuska: *E. coli*).<sup>61</sup> Francuska opisuje pojavu nove alelske varijante VIM-2 u *Pseudomonas aeruginosa* koja je do danas najčešće opisana i najviše proširena u Europi i svijetu.<sup>78</sup> U Europi su osim Italije, Grčke i Francuske, pojavu VIM-2 enzima u izolatima *P. aeruginosa* zabilježile i Portugal, Španjolska, Poljska, Belgija, Njemačka, Švedska, Norveška, Hrvatska, Mađarska, a nedavno i Srbija.<sup>61,79,80</sup> Članci ukazuju i na proširenost u Aziji i Južnoj Americi uz opise novih varijanti - VIM-3 u Tajvanu, VIM-5 u Turskoj, VIM-7 u Texasu, SAD.<sup>61,81,82</sup> Alelske varijante VIM-7 do 11-a i b opisane su u *Pseudomonas aeruginosa* izoliranih iz Engleske, Južne Amerike i Italije pri čemu je dio rezultata publiciran, dok su neke alelske varijante samo prijavljene genskoj bazi podataka.<sup>83,84</sup> Skupina autora iz Grčke opisala je u izolatima *K. pneumoniae* novu varijantu

metalo- $\beta$ -laktamaze VIM tipa nazvanu VIM-12 koja nalikuje na hibrid VIM-1/VIM-2.<sup>85</sup> U Španjolskoj je opisana varijanta VIM-13<sup>86</sup>, U Bugarskoj VIM-15<sup>87</sup>, Njemačkoj VIM-16<sup>87</sup>, VIM-17 u Grčkoj<sup>88</sup> te VIM-18 u Indiji.<sup>89</sup> U Europi i Aziji su geni za metalo- $\beta$ -laktamaze tipa VIM-2 do VIM-5 otkriveni i u enterobakterijama (*Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) te u nizu nefermentativnih bakterija (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*).<sup>61,90,91</sup> Filogenetsku srodnost dijela MBL iz porodice VIM (od VIM-1 do VIM-11) prikazuje slika 3.<sup>61</sup>



**Slika 3. Filogenetsko stablo metalo- $\beta$ -laktamaza VIM-tipa.<sup>61</sup>**

Nisu prikazane sve varijante. Sekvence su uspoređene i filogenetsko stablo dobiveno je metodom Clustal W (PAM250 matrix; DNA Star) uz "neighbor-joining".



Treći tip metalo- $\beta$ -laktamaze, SPM-1 iz *Pseudomonas aeruginosa* opisan je u Brazilu 1997. godine, a zatim i u drugim zemljama Južne Amerike,<sup>92,93</sup> sasvim skoro i u Europi,<sup>94</sup> dok se četvrti, GIM-1, opisan 2002. godine u *Pseudomonas aeruginosa* nije još proširio izvan zemlje porijekla, Njemačke.<sup>66</sup> Tablica 3 prikazuje zemljopisnu distribuciju i osnovne značajke najčešćih metalo- $\beta$ -laktamaza u svijetu.

**Tablica 3. Distribucija IMP-, GIM-, SPM- i VIM-tip metalo- $\beta$ -laktamaza gena.<sup>a</sup>**

MBL tip	MBL varijanta	Bakterija i domaćin	Zemlja porijekla <sup>b</sup>	Genski smještaj	Lokacija <sup>b</sup>	IPM MIK ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>b</sup>
GIM	GIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Njemačka	Klasa 1 integrona	plazmid	>32
IMP	IMP-1	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
			Engleska	n.n.	n.n.	64
		Italijska	Italijska	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
			Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	8->32
			Koreja	n.n.	n.n.	n.n.
		<i>Acinetobacter spp.</i>	Brazil	n.n.	n.n.	n.n.
			Engleska	n.n.	n.n.	>4
			Japan	n.n.	n.n.	8->32
		<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Burkholderia cepacia</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Citrobacter freundii</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	1->32
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Escherichia coli</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japan	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	64->128
			Singapur	n.n.	konjugativni plazmid	128
		<i>Morganella morganii</i>	Japan	n.n.	n.n.	1->32
		<i>Proteus vulgaris</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Providencia rettgeri</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	1->32
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brazil	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
			Japan	Klasa 1 i 3 integrona	konjugativni plazmid	1->128
Singapur	n.n.		n.n.	n.n.		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Brazil		n.n.	n.a	n.n.	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.a	n.n.		
	Koreja	n.n.	n.n.	n.n.		
	Singapur	Klasa 1 integrona	plazmid	>32		

	<i>Pseudomonas putida</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	konjugativni plazmid/n.n.	8->128
		Singapur	n.n.	plazmid	0,5
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japan	Klasa 1 integrona	kromosom	1-32
	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	Klasa 1 i 3 integrona	konjugativni plazmid/n.n.	2->128
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italija	Klasa 1 integrona	kromosom	>64
		Japan	Klasa 1 integrona	plazmid	8->32
	<i>Acinetobacter lwofii</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	>32
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japan	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	3.1 <sup>c</sup>
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	Klasa 1 integrona	kromosom	0,5->32
	<i>Citrobacter youngae</i>	Kina	Klasa 1 integrona	plazmid	3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kina	n.n.	n.n.	n.n.
		Australija	n.n.	n.n.	>32 <sup>c</sup>
IMP-5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	Klasa 1 integrona	kromosom	>32
IMP-6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brazil	n.n.	n.n.	>32
	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	32
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kanada	Klasa 1 integrona	n.n.	>512
		Malezija	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
		Singapur	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
IMP-8	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tajvan	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	0,5->128
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tajvan	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	0,5-8
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kina	Klasa 1 integrona	(prenosiva))	n.n.
IMP-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Klasa 1 integrona	kromosom/plazmid	>128
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	Japan	Klasa 1 integrona	plazmid	>128
IMP-11	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	n.n.	plazmid	n.n.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Italija	Klasa 1 integrona	plazmid	32
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italija	Klasa 1 integrona, Tn5051	kromosom/plazmid	64
IMP-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tajland	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tajland	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brazil	Klasa 1 integrona	kromosom	>16
IMP-17	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SAD	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-19	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
IMP-20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.

	IMP-21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	n.n.	n.n.	n.n.
	IMP-22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italija	Klasa 1 integrona	plazmid	32
SIM	SIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Koreja	Klasa 1 integrona	kromosom	8-16
SPM	SPM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brazil	IS, "mobilni genomski otok"	kromosom/plazmid	>128
VIM	VIM-1	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Italija	Klasa 1 integrona	plazmid	>128
		<i>Escherichia coli</i>	Grčka	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	4-8
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grčka	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	4-32
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	France	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	64
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italija	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
		<i>Pseudomonas putida</i>	Italija	Klasa 1 integrona	plazmid	>32
	VIM-2	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	Koreja	Klasa 1 integrona	n.n.	32
		<i>Acinetobacter</i> genomsp. 3	Koreja	Klasa 1 integrona	n.n.	32
		<i>Citrobacter freundii</i>	Tajvan	n.n.	konjugativni plazmid	1
		<i>Enterobacter cloacae</i>	Koreja	Klasa 1 integrona	n.n.	4
			Japan	n.n.	n.n.	1->32
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>Hrvatska</b>	<b>Klasa 1 integrona</b>	<b>kromosom</b>	<b>&gt;128</b>
			Francuska	Klasa 1 integrona	kromosom/plazmid	32-64
			Njemačka	Klasa 1 integrona	kromosom	128
			Grčka	Klasa 1 integrona	n.n.	>8
			Italija	Klasa 1 integrona	plazmid	>128
			Poljska	Klasa 1 integrona, Tn5051	kromosom	>256
			Portugal	Klasa 1 integrona	n.n.	>32
			Španjolska	n.n.	plazmid	256
			Švedska	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
			Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	1->128
			Koreja	n.n.	kromosom/plazmid	8->128
			Argentina	n.n.	n.n.	n.n.
			Čile	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
			Venezuela	Klasa 1 integrona	Kromosom	>128
			SAD	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Čile	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
			Japan	Klasa 1 i 3 integrona	n.n.	n.n.
		<i>Pseudomonas putida</i>	Japan	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
			Koreja	n.n.	kromosom/plazmid	16->128
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tajvan	n.n.	kromosom	>32
		<i>Serratia marcescens</i>	Koreja	Klasa 1 integrona	n.n.	64
	VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tajvan	n.n.	kromosom	16-32
	VIM-4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Italija	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	2
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Italija	Klasa 1 integrona	konjugativni plazmid	4

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grčka	Klasa 1 integrona	kromosom	>32
		Mađarska	Klasa 1 integrona	plazmid/kromosom	64->128
		Poljska	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
		Švedska	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turska	Klasa 1 integrona	n.n.	n.n.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turska	Klasa 1 integrona	n.n.	>128
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Singapur	n.n.	plazmid	>32
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SAD	Klasa 1 integrona	plazmid	>128
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kolumbija	n.n.	n.n.	32->256
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UK	n.n.	n.n.	n.n.
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UK	n.n.	n.n.	n.n.
VIM-11a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	Klasa 1 integrona	n.n.	512
VIM-11b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italija	n.n.	n.n.	n.n.
VIM-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grčka	n.n.	n.n.	n.n.
VIM-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Španjolska	Klasa 1 integrona	kromosom	n.n.
VIM-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Španjolska	n.n.	n.n.	n.n.
VIM-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bugarska	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
VIM-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Njemačka	Klasa 1 integrona	kromosom	>128
VIM-17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grčka	Klasa 1 i ntegrona	kromosom	>128
VIM-18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Indija	Klasa 1 integrona	kromosom	>128

<sup>a</sup> Modificirano i nadopunjeno prema<sup>61,77,79,95</sup>

<sup>b</sup> n.n., podaci nisu navedeni

<sup>c</sup> određeno E-testom

## 1.5 OTPORNOST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA KARBAPENEMSKE ANTIBIOTIKE KOJA NIJE POSREDOVANA MBL

### 1.5.1 KARBAPENEMAZE KOJE NISU MBL

Vrlo rijetko, otpornost na karbapeneme može biti posljedica djelovanja stečenih karbapenemaza iz ostalih Amblerovih klasa, poput već spomenute GES-2 (klasa A) karbapenemaze koja je mutacijska varijanta  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra GES-1, iz *Pseudomonas aeruginosa* izolata iz Južne Afrike.<sup>45,96</sup> Čini se da kliničku značajnost dobija u vrstama koje mogu još

jednim dodatnim mehanizmom, poput smanjene propustljivosti i/ili efluksa utjecati na smanjenje aktivnosti karbapenema. U Amblerovoj klasi D, u izolatima *Pseudomonas aeruginosa* opisana je oksacilinaza s karbapenem-hidrolizirajućim svojstvima OXA-50, koja je poput AmpC cefalosporinaze konstitutivno prisutna, a može posredovati blagu rezistenciju na karbapeneme s neznatnim povećanjem MIK-ova do 8 µg/ml.<sup>96,31</sup> Recentna istraživanja navode i varijante AmpC cefalosporinaze, koje mogu posredovati rezistenciju na oksiiiminocefalosporine i karbapeneme, a inhibirane su kloksacilinom.<sup>97</sup>

### **1.5.2 PROMJENE VANJSKE MEMBRANE**

Osim učinka hidrolizirajućih enzima, važan činitelj rezistencije i selekcije multiplo-rezistentnih sojeva u *Pseudomonas aeruginosa* je i zajednička igra smanjene propusnosti stanične membrane mutacijama koje dovode do neaktivnosti propusnih porina te pojačane aktivnosti efluksa, odnosno crpki koje neselektivno izbacuju niz antibiotika iz bakterije, kao što je detaljno opisano u poglavlju o urođenoj otpornosti.<sup>26-28</sup> Tablica 4 prikazuje utjecaj najčešćih mehanizama rezistencije u pseudomonasa na osjetljivost prema β-laktamskim antibioticima.

### **1.6 SMJEŠTAJ I NAČIN PRIJENOSA GENA KOJI KODIRAJU MBL**

Gotovo svi do sada opisani geni koji kodiraju IMP- i VIM metalo-β-laktamaze nalaze se na genskim kazetama klase 1 integrona (iznimno je IMP opisan i u klasi 3 integrona), bilo na kromosomu ili na plazmidu.<sup>61</sup> Integroni su prirodan sustav genskog kloniranja koji ima elemente neophodne za mjesto-specifičnu rekombinaciju (integraciju i eksciziju) te ekspresiju

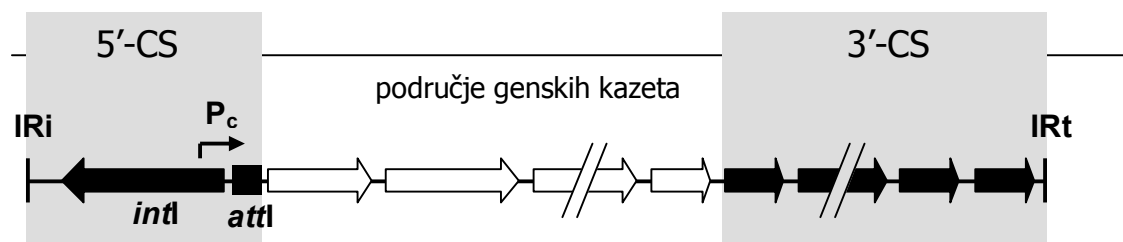
strane DNA.<sup>98,99</sup> Klasa 1 integrona posjeduje tri regije: dvije konzervirane (5'CS i 3'CS) te jednu varijabilnu.

**Tablica 4. Najčešći mehanizmi rezistencije i utjecaj na  $\beta$ -laktame u *P. aeruginosa*.**

<b>Mehanizam</b>	<b>Ureidopenicilini</b>	<b>Cefalosporini</b>	<b>Karbapenemi (imipenem)</b>
Derepresija AmpC	R	r/R	r/S
Hiperekspresija MexAB-OprM	R	R	S
Gubitak oprD	S	S	R
Hiperekspresija MexAB-OprM i gubitak OprD	R	R	R

Konzervirana regija locirana na 5' kraju naziva se i 5' konzervirani segment (5'-CS) koji obilježavaju četiri osnovne odrednice: 25-bp sekvencija obrnutih ponavljanja (IRi) koja se prepoznaje u blok-transpoziciji integrona (integroni se prenose aktivnim ili defektivnim transposonima), gen integraze (*intI*) koji kodira IntI mjesto-specifičnu rekombinazu koja je odgovorna za integraciju ili eksciziju kazete, rekombinacijsko mjesto (*attI*) u blizini *intI* gena,

koje je ciljno mjesto za integraciju nove kazete, i promotor  $P_c$  za ekspresiju nizvodnih kazeta lociran u *IntI* genu.<sup>100-102</sup>



**Slika 4. Strukturna organizacija integrona.**

Integroni završavaju obrnuto-ponavljajućim dijelovima ("inverted repeats"-IR), te na oba kraja imaju dva konzervirana dijela (5'-CS i 3'-CS) koji zatvaraju varijabilnu regiju genskih kazeta. Pojedine genske kazete predstavljene su strelicama, a *attI* rekombinacijsko mjesto kvadratićem. *intI* gen je inverzno orijentiran.  $P_c$  je promotor gena genske kazete.

Klasa integrona je definirana prirodom *intI* gena u 5'-CS, koji je povezan sa specifičnom *attI* sekvencijom. Konzervirana regija na 3' kraju (3'-CS) može biti varijabilna. Uobičajeno se sastoji od niza ancestralnih kazeta, poput *qacEΔ1*, *sul1*, ORF5, ORF6, (od kojih su neke parcijalno aktivne ili potpuno izbrisane) koje su izgubile svoju mobilnost. Ove kazete slijedi ancestralni *tni* modul sa setom transpozicijskih gena (*tniA*, -B, and -Q), resolvazom (*tniR*) i *res*

mjestom koje se može promijenti insercijskom sekvencom (IS). Na 3' kraju nalazi se također sekvencija od 25-bp obrnutih ponavljanja (IRt) koja se prepoznaje u blok transpoziciji.<sup>103</sup>

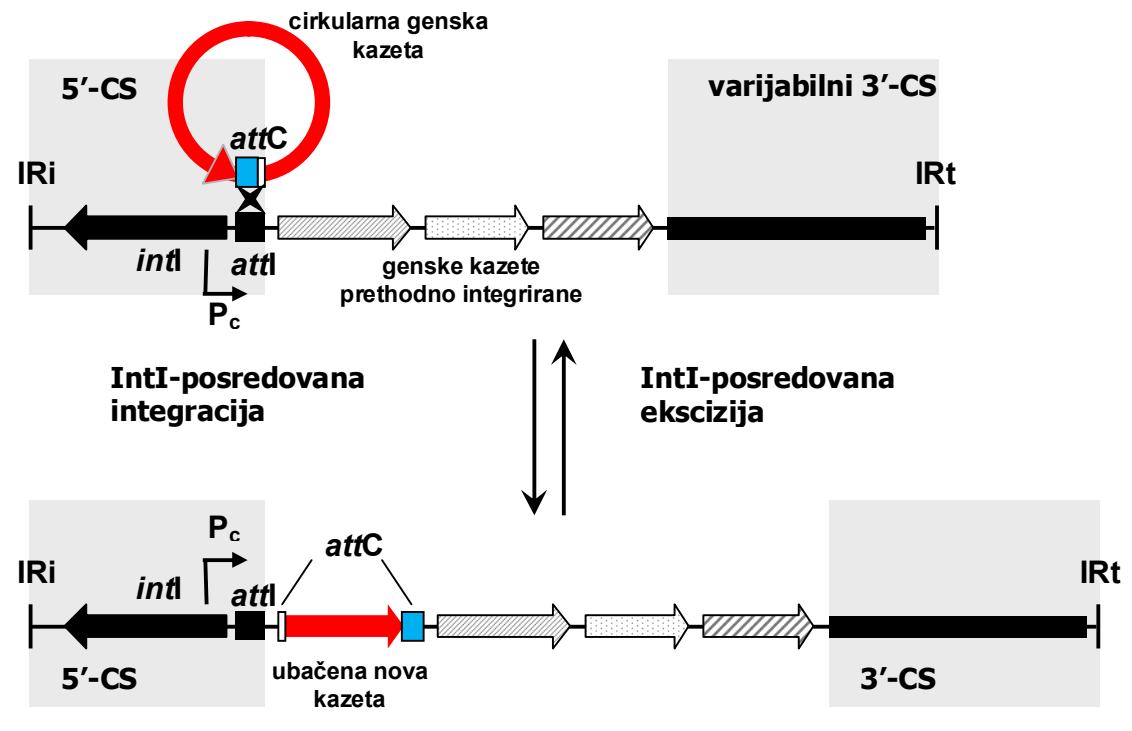
Varijabilna regija integrona obično ima nekoliko genskih kazeta (u nekih *Vibrio* spp. može ih biti do stotinu) koji sadržavaju gene koji posreduju rezistenciju na antibiotike i dezinficijense, iako ponekad i gene koji kodiraju proteine nepoznate funkcije.<sup>104</sup>

U integronima koji kodiraju MBL, najčešće su geni koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide (*aacA*, *aadA*, *aphA*), trimetoprim (*dfp* varijante), kloramfenikol (*catB*, *cmlA*), druge  $\beta$ -laktame (*bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>PSE</sub>* varijante) ili proteine nepoznate funkcije (*orfD*, *orfE*, *orfX*, others). Klinički značaj različitih genskih kazeta u sustavu integrona je što uporabom jednog antibiotika koji inducira rezistenciju dobijemo koselekciju svih rezistencija u pratnji.<sup>103-107</sup>

Integroni se danas nazivaju po genskim kazetama. Genska kazeta je mobilna jedinica koja se sastoji od DNK fragmenta s jednim ORF, koji slijedi kratka sekvenca koja se zove *attC* mjesto ili 59-bp element (59-be) koji predstavlja sekundarno mjesto za specifičnu rekombinaciju s integrazom na *attI*, kao što prikazuje slika 5.<sup>102,108,109</sup>

Struktura *attC* razlikuje se od *attI*. *AttI* ima dva jednostavna mjesta ("simple site") odvojena s preko 10 bp, od kojih je svako sastavljeno od para inverzno orijentiranih *IntI* vezujućih domena. Unutar *attC*, odnosno 59-be nalazi se inverzno središnje mjesto ("inverse core site"; 1L) i središnje mjesto ("core site"; 1R) koji su savršeni palindromi i važni su u integracijskom procesu (Slika 6). Iako redosljed baza unutar središnjeg mjesta može malo varirati obično odgovara redosljedu GTTRRRY (R: A/G: Y:T/C).



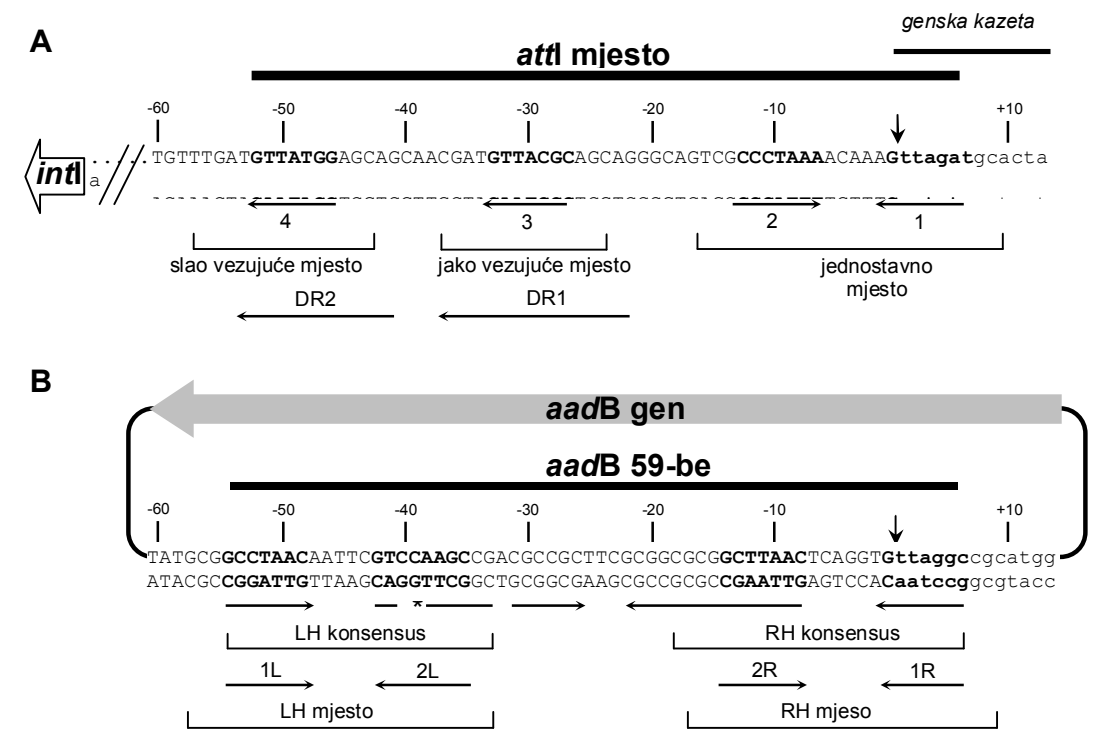


**Slika 5. Cirkularni model insercije gena.<sup>109</sup>**

Rekombinacija između *attI* i *attC* mjesta događa se između G i TT mjesta u jednostavnom mjestu *attI* i središnjeg mjesta u *attC*. Na taj način u linearno postavljenoj kazeti, dio *attC* mjesta ostaje uzvodno (IR ili središnje mjesto), a dio *attC* mjesta nizvodno (ostatak 59-be dijela gena).

Mobilne kazete nalaze se u dva oblika: cirkularnoj intermedijarnoj ili mobilnoj formi te integriranoj ili funkcijskoj formi.<sup>108</sup> Kada su u cirkularnom obliku, nalaze se samostalne unutar stanice te kao takve ne mogu dugo perzistirati tijekom dijeljenja stanice. Kada su unutar

integrona, onda su u linearnoj, odnosno integriranoj formi. Genske kazete obično nemaju promotorski gen. S obzirom da je *attI* rekombinacijsko mjesto jedinstveno i locirano uzvodno od područja genskih kazeta, posljednja kazeta koja će se integrirati biti će uz *P<sub>c</sub>*, odnosno glavni promotor.



**Slika 6. Struktura *attI* i *attC* (59-be) mjesta.**

*A*: Redoslijed baza u *attI* s prikazom jednostavnog mjesta unutar kojeg je vertikalnom strelicom označeno mjesto rekombinacije (između baza G i TT; baze označene malim slovima pripadaju integriranoj genskoj kaseti).

*B*: Redoslijed baza *attC* (59 be) cirkularnog intermedijara s *aadB* genom. Puna linija predstavlja 59-be definiran konsenzusom. Središnja mjesta sa sedam baza (1R, 1L, 2R i 2L) označena su istaknutim slovima. Unutar 1R središnjeg mjesta vertikalna strelica prikazuje mjesto rekombinacije kao i u *A* dijelu slike. Horizontalne strelice prikazuju orijentaciju.

Kazete koje su najbliže promotoru biti će najuspješnije prepisane.<sup>103</sup> Ovi su promotori upravo u pseudomonasa vrlo aktivni (visoki MIK-ovi za imipenem), a slabo u enterobakterijama (niski MIK-ovi) zbog čega se dobijaju različiti fenotipovi rezistencije.

Geni u integronima mogu se slobodno kretati iz jednog integrona u drugi, ali im za horizontalni prijelaz iz jednog mikroorganizma u drugi treba pomoć drugih genetskih elemenata kao što su plazmidi i transposoni. Integroni, s izuzetkom Tn402 (ili In16), nisu u mogućnosti napraviti transpoziciju s obzirom da im nedostaje *tni* modul na 3' kraju te se ne mogu sami mobilizirati. Stoga se integroni nalaze u sklopu većih mobilnih elemenata kao što su najčešće, klasa I i II transposona koji mogu u sastavu konjugativnih plazmida, konjugativnih transposona ili mobilnih genomskih otoka prijeći iz stanice u stanicu.<sup>110</sup> U *P. aeruginosa* integroni koji sadržavaju MBL locirani su u kromosomu te diseminacija integrona ili transposona između epidemiološki nesrodnih sojeva ostaje predmet nagađanja. Moguće su u pitanju konjugativni transposoni, integrirani plazmidi ili genomski otoci.<sup>93</sup> Iako ove strukture nisu mobilne, budući da imaju niz mobilnih elemenata u sebi, mogu predstavljati ciljno mjesto za inserciju egzogenih, ali mobilnih struktura.

## **1.7 KLINIČKO-EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ MBL**

Opći koncept epidemiologije temelji se u kontroli zdravlja i bolesti u definiranoj populaciji: to je nauka o činiteljima koji utječu na zdravlje ili pojavu bolesti, njihovoj raznolikosti, učestalosti, raspodjeli i rezervoaru.<sup>111</sup> Učestalost neke pojave pa tako i bolesti može biti sporadična (povremeno javljanje), endemična (pravilno ili kontinuirano javljanje), epidemijska (značajno veća učestalost) ili pandemijska (epidemijska učestalost u različitim zemljama).

Epidemiološke studije omogućavaju nam spoznaju činitelja koji su važni za pojavu neke bolesti i njene učestalosti kako bi se mogle poduzeti primjerene mjere za sprječavanje širenja i ponovne pojave iste.

Epidemiologija stečenih metalo- $\beta$ -laktamaza u određenoj populaciji bakterija zahtijevati će uporabu niza fenotipskih i molekularnih metoda kako bi se odredilo njihovo prisustvo i činitelji koji utječu na njihovu pojavu, raznolikost, raspodjelu te otkrili eventualni rezervoari takvih mikroorganizama. Konačan klinički značaj izolata *Pseudomonas aeruginosa* koji posjeduje metalo- $\beta$ -laktamazu očituje se u *in vivo* rezistenciji na  $\beta$ -laktamske antibiotike, odnosno kliničkom neuspjehu terapije s  $\beta$ -laktamskim antibiotikom, uključujući i karbapeneme, a vrlo često i predstavnikom iz ostalih klasa antipseudomonasnih antibiotika.

Što se epidemiološkog potencijala tiče, do sada su sojevi koji posjeduju stečene gene za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaza uglavnom opisivani kao sporadične pojave ili uzročnici manjih nozokomijalnih epidemija.<sup>50,105,112</sup> No međutim postoje i literaturna izvješća o većim epidemijama u zemljama Južne Europe, Azije i Južne Amerike (nozokomijalne epidemije opisane su u Italiji, Grčkoj i Francuskoj, u Koreji 11% imipenem rezistentnih izolata posjeduje MBL, dok 20% imipenem-rezistentnih izolata u Brazilu posjeduje SPM-1).<sup>94,113-115</sup> U novijim izvješćima zabrinjavaju podaci o širenju gena za metalo- $\beta$ -laktamaze s *Pseudomonas aeruginosa* na enterobakterije, odnosno ponavljanje kliničkog scenarija koji uvelike podsijeća na globalno širenje  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra.<sup>116</sup>

Ako dođe do širenja gena koji kodiraju metalo- $\beta$ -laktamaze među nozokomijalnim sojevima *Pseudomonas aeruginosa* i drugih Gram-negativnih bakterija, uz spoznaju da ovi enzimi hidroliziraju svaki  $\beta$ -laktam te da smo godinama daleko od uvođenja terapijskog inhibitora, možemo očekivati novu kliničku katastrofu.

## 1.8 LABORATORIJSKE METODE DETEKCIJE MBL I TIPIZACIJE IZOLATA

Standardne tehnike za detekciju MBL temelje se na fenotipskim testovima i molekularnom probiru.<sup>61</sup> Sve fenotipske metode proučavaju kombinaciju supstrata (imipenem, meropenem) i inhibitora (EDTA ili 2-merkaptopropionska kiselina, fenantrolin).<sup>117</sup> Ove metode imaju različitu osjetljivost i dobre su kada se radi probir na velikom broju izolata. Metode bazirane na PCR-u, budući da ne zahtijevaju puno vremena, obično su metoda izbora kako bi se rezultat dobio što prije.

Tehnike fenotipske tipizacije uključuju serotipizaciju, biotipizaciju i rezistotipizaciju. Genotipizacija se obično temelji na PCR tehnikama (specifični PCR, RAPD, ribotipizacija), tehnikama koje se koriste restrikcijskim enzimima (makrorestrikcija genoma, RFLP) ili sekvenciranju (tipizacija alela, MLST).<sup>118,119</sup> Ove brojne tehnike ne daju uvijek iste vrste podataka, a i pouzdanost im je jako varijabilna. Glavni problem koji je proizašao iz ovako velikog broja tehnika je nemogućnost usporedbe epidemioloških rezultata koje su dobile različite istraživačke grupe. Ovaj će se problem u budućnosti riješiti vjerojatno korištenjem standardizirane sheme za tipiziranje multilokusa u *P. aeruginosa*, koja će omogućiti pohranjivanje i laku usporedbu redosljeda sedam specifičnih alela u on-line bazi podataka. Tehnika ostaje za sada, zbog skupoće, nedostupna većini manjih istraživačkih laboratorija.<sup>119</sup> Tablice 5 i 6 prikazuju sadašnje metode detekcije MBL i metode tipizacije izolata.<sup>61</sup>

**Tablica 5. Načini detekcije metalo- $\beta$ -laktamaza u *P. aeruginosa*.**

Test	Supstrat-inhibitor	Prednost	Nedostatci
<b>Fenotipske tehnike</b>			
Disk difuzija	Imipenem i EDTA	Laka izvedba Laka interpretacija	Nije standardizirana MBL-pozitivne bakterije mogu biti imipenem osjetljive
Mikrodilucijski test	Imipenem i EDTA te 1,10-fenantrolin	Laka izvedba Laka interpretacija	Dugo traje Zahtjevna MBL-pozitivne bakterije mogu biti imipenem osjetljive
E-test (trakica)	Imipenem i EDTA	Laka izvedba Laka interpretacija	MBL-pozitivne bakterije mogu biti imipenem osjetljive
Hidroliza karbapenema	Meropenem, imipenem i EDTA	Visoka osjetljivost	Dugo traje Zahtjevna Interpretacija zahtjevna
<b>Molekularne tehnike</b>			
Specifični PCR		Laka izvedba Veliki broj uzoraka odjednom Loša pouzdanost Može se povezati s RFLP i sekvenciranjem	Lažno pozitivno, lažno negativno Detekcija novih varijanata
Hibridizacija/DNA probe		Dobra detekcija, pouzdana Veliki broj uzoraka testira se odjednom (colony-blot)	Dugotrajna (ekspozicija) Detekcija novih varijanata Skupe
Kloniranje i sekvenciranje		Pouzdana	Teške za izvođenje

**Tablica 6. Metode tipizacije izolata *P. aeruginosa*.**

<b>Metoda</b>	<b>Princip</b>	<b>Prednost</b>	<b>Nedostatak</b>
<b>Fenotipske tehnike</b>			
Serotipizacija	Reakcija s različitim protuserumima	Brza	Skupa, slabo diskriminatorsna <i>P. aeruginosa</i> može biti poliaglutinabilan 10% izolata ostaje neserotipabilno
Biotipizacija (uključujući MLEE)	Različite metaboličke sposobnosti stanice	Obično lako automatizirana (osim MLEE)	Ponekad pogrešna identifikacija vrste MLEE skupa i dugotrajna
Rezistotipizacija	Reakcija s različitim antibioticima	Laka izvedba	Dugotrajno očitavanje Lažno pozitivni rezultati
<b>Molekularne tehnike</b>			
Specifični PCR	Detekcija gena, mapa	Laka izvedba Veliki broj uzoraka odjednom Može se povezati s RFLP i sekvenciranjem	Lažno pozitivna, lažno negativna Loša pouzdanost
RAPD	PCR-bazirana metoda uz uporabu jedne početnice koja slučajno amplificira pojedine dijelove genoma	Veliki broj uzoraka odjednom	Skupa, pitanje reproducibilnosti Nemogućnost internacionalne usporedbe
Ribotipizacija	PCR-bazirana metoda s amplifikacijom ribosomske DNA uz RFLP	Pouzdana	Loša diskriminacija Nemogućnost internacionalne usporedbe
RFLP	Restriksijska analiza uz različite enzime	Pouzdana, razlikuje varijante gena	Skupa
Makrorestrikcija (PFGE)	Analiza genoma restrikcijom i separacijom u pulzirajućem polju	Standardna metoda tipizacije	Dugotrajna Skupa Naporna Nemogućnost internacionalne usporedbe

MLST	Parcijalno sekvenciranje sedam alela PCR-om	Precizna Internacionalna usporedba podataka	Skupa Na početku dugotrajna i naporna
Hibridizacija/DNA probe	Detekcija i lokacija gena uporabom specifičnih proba	Dobra detekcija, pouzdana Veliki broj uzoraka odjednom (colony-blot)	Dugotrajna (ekspozicija) Detekcija varijanata Skupa

*MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) multilokusna enzimska elektroforeza; PCR (polymerase chain reaction), lančana reakcija polimeraze; RAPD (random amplified DNA polymorphism) polimorfizam nasumično umnožene DNA; RFLP (restriction fragment length polymorphism) polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata; PFGE (pulsed field gel electrophoresis) elektroforeza u pulzirajućem polju; MLST (multilocus sequence typing) tipizacija multilokusnih sekvenci.*

## **1.9 NEODGOVORENA PITANJA U DOSADAŠNJIM ISTRAŽIVANJIMA**

Prvi multiplorezistentni sojevi *Pseudomonas aeruginosa* koji posjeduju gene za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaza i to VIM-2 tipa u Hrvatskoj pojavili su se 2000. godine u Kliničkoj bolnici Split.<sup>120</sup> Nedavno su slični izolati opisani i iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb.<sup>121</sup>

Po posljednjem godišnjem izvješću Nacionalnog odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike za 2008. godinu, u Republici Hrvatskoj, otpornost *Pseudomonas aeruginosa* na karbapeneme, ovisno o pojedinom centru, kretala se u rasponu od 0-25 %.<sup>122</sup> Za sada nemamo znanstvenih podataka o mehanizmima otpornosti izolata *P. aeruginosa* na karbapeneme. Nadalje, po literaturnim pokazateljima, čini se da za *Pseudomonas aeruginosa* podatci o otpornosti na antibiotike (posebice  $\beta$ -laktamske) proizašli obradom rezultata testiranja disk difuzijskom metodom (najčešćom rutinskom metodom), nisu sasvim točni zbog poteškoća



detekcije stvarne rezistencije i čestog proglašavanja osjetljivog soja umjereno osjetljivim odnosno rezistentnim. Ovo se posebice odnosi na karbapeneme pa kliničari mogu dobiti pogrešne podatke o osjetljivosti izoliranih sojeva.<sup>123,124</sup> Stoga je opravdano istražiti kolika je podudarnost postojeće rutinske, disk difuzijske metode s mikrodilucijom u bujonu, upravo u sojeva *Pseudomonas aeruginosa*. sa smanjenom osjetljivošću na karbapenemske antibiotike.

Nadalje, do sada nije istraživano kolika je zastupljenost MBL gena u sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izoliranih iz kliničkih uzoraka u ovoj regiji Europe, kao ni da li se geni koji kodiraju MBL s obzirom na drugačije nozokomijalno, odnosno okolišno okruženje razlikuju od do sada opisanih. Nadalje, nije poznato koji su načini širenja ovih gena među nozokomijalnim izolatima kao ni s kojim su genima koji kodiraju druge mehanizme otpornosti povezani geni koji kodiraju metalo- $\beta$ -laktamaze u našoj sredini. Ostaje neistraženo koliko su genetski slični izolati *P. aeruginosa* otporni na karbapeneme, s kojim su kliničko-epidemiološkim obilježjima bolesnika povezani takovi izolati i koja su obilježja hospitalizacije bolesnika u kojih se izoliraju sojevi *Pseudomonas aeruginosa* s otpornošću prema karbapenemima po dužini liječenja, cijeni koštanja i konačnom ishodu.

## **2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2.1 OPĆI CILJ ISTRAŽIVANJA**

Utvrđiti kliničko-epidemiološki značaj sojeva *Pseudomonas aeruginosa* u kojih je otpornost na karbapenemske antibiotike posredovano metalo- $\beta$ -laktamazama.

### **2.2 SPECIFIČNI CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

A Utvrđiti postojanje i karakteristike metalo- $\beta$ -laktamaza u kliničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapenemske antibiotike.

B U sojeva koji ne posjeduju metalo- $\beta$ -laktamaze odrediti vjerojatni mehanizam rezistencije na karbapenemske antibiotike.

C Genotipizirati izolate i utvrđiti njihovu srodnost, proširenost te odnos prema serotipovima i rezistotipovima.

D Utvrđiti pouzdanost dostupnih laboratorijskih metoda u testiranju osjetljivosti *Pseudomonas aeruginosa* s otpornošću na karbapenemske antibiotike.

E Procijeniti klinički značaj izolacije soja *Pseudomonas aeruginosa* otpornog na karbapenemske antibiotike s obzirom na mogući utjecaj na duljinu hospitalizacije i konačan ishod bolesnika.

### **3 HIPOTEZA**

Pretpostavka je da se alelske varijante gena za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaza kao i integronske mobilne jedinice koje ih prenose u sojeva *Pseudomonas aeruginosa* razlikuju od do sada opisanih zbog bakterijske prilagodbe drugačijem okruženju.

Pretpostavka je da će genotipizacija sojeva ukazati na proširenost i klonsku srodnost metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih izolata.

### **4 MATERIJAL**

#### **4.1 IZOLATI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

U radu je korištena zbirka prikupljenih izolata *Pseudomonas aeruginosa*, iz svih kliničkih uzoraka bolesnika liječenih u svim odjelima Kliničkog bolničkog centra Split, koji su pokazali u rutinskom laboratorijskom radu smanjenu osjetljivost na karbapeneme (zona inhibicije za imipenem i/ili meropenem  $\leq 13$  mm i/ili minimalna inhibicijska koncentracija za imipenem i/ili meropenem  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) u razdoblju od 2001. do 2007. godine. Od 2003. do 2007. godine izolati su prikupljeni uzastopno, a priključeni su im i nasumce prikupljeni izolati iz 2001. i 2002. godine. Sojevi duplikati (isti soj od istog bolesnika s istim antibiogramom izoliran tijekom 30 dana) nisu bili uključeni u zbirku. Zbirka je ukupno obuhvatila 169 sojeva.

Dva inicijalna *Pseudomonas aeruginosa* izolata u kojih je po prvi puta otkrivena MBL iz 2000. godine nazvani su indeks izolati (indeks 1 i indeks 2) i korišteni su samo u usporedbama genotipova i analizi MBL pozitivnih sojeva.

Kontrolne sojeve koji su korišteni u ovom radu prikazuje Tablica 7.

**Tablica 7. Kontrolni sojevi korišteni u ovom radu.**

Bakterijski soj	Karakteristika soja	Literaturni izvor
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Kontrolni soj u testu osjetljivosti	CLSI, 2006. <sup>125</sup>
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	"Divlji soj", pozitivna kontrola u detekciji gena <i>oprD</i> , <i>ecfX</i>	Stover i sur. <sup>126</sup>
<i>P. aeruginosa</i> VR-143/97	VIM-1 pozitivan, pozitivna kontrola u metodama detekcije <i>bla<sub>VIM</sub></i> gena	Lauretti sur. <sup>50</sup>
<i>P. aeruginosa</i> VA-182/00	VIM-2 pozitivan, pozitivna kontrola u metodama detekcije <i>bla<sub>VIM</sub></i> gena /integrona	Docquier i sur. <sup>64</sup> Riccio i sur. <sup>127</sup>
<i>A. baumannii</i> AC54/97	IMP-2 pozitivan, pozitivna kontrola u detekciji <i>bla<sub>IMP</sub></i> gena	Riccio i sur. <sup>72</sup>
<i>P. aeruginosa</i> 463/98	PER-1 pozitivan, pozitivna kontrola u detekciji <i>bla<sub>PER</sub></i> gena	Pagani i sur. <sup>128</sup>
<i>P. aeruginosa</i> TNP065	Negativna kontrola u detekciji <i>oprD</i> gena i proteina	Yoneyama i sur. <sup>129</sup>

## 4.2 KLINIČKI PODATCI BOLESNIKA

Svakom bolesniku kojem su pripadali izolati *Pseudomonas aeruginosa* otporni na karbapenemske antibiotike istraženi u ovom radu retrospektivno je iz povijesti bolesti popunjen upitnik (Prilog 1) iz kojeg su se analizirali sljedeći podaci: spol, dob, odjel hospitalizacije, ukupna duljina hospitalizacije, osnovna dijagnoza bolesnika, dijagnoza vezana za mikrobiološki uzorak iz kojeg je izoliran *P. aeruginosa*, vrsta antibiotske terapije prije izolacije soja (koja je trajala  $\geq 48$  sati), vrsta antibiotske terapije nakon izolacije soja, prethodni operacijski (invazivni) zahvati, prisustvo CVK, mehanička ventilacija, trajni urinski kateter, prisustvo drugog biomaterijala, konačan ishod bolesnika (preživljavanje - otpust poboljššan ili nepromijenjen, odnosno smrt u razdoblju od 30 dana od izolacije soja).

## 5 METODE ISTRAŽIVANJA

### 5.1 IDENTIFIKACIJA IZOLATA

*Pseudomonas aeruginosa* identificirani su prisustvom pigmenta, pozitivne reakcije oksidaze, pokretljivošću i oksidativnom razgradnjom glukoze, a oksidaza pozitivni sojevi bez pigmenta identificirani su uporabom API NE (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska) identifikacijskog kita, odnosno GN kalorimetrijske identifikacijske kartice VITEK 2 automatiziranog sustava (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska).

## 5.2 MEDIJI UZGOJA

Tijekom laboratorijskog dijela rada korišteni su sljedeći mediji: agar (agar baza Blood agar base, BioRad) s dodatkom 5% ovčje krvi (Veterinarski zavod Split), Mueller Hinton Medium (BD, Njemačka), Mueller Hinton II Broth (BD, Njemačka), Luria Bertoni bujon (10g/l tripton, 5g/l ekstrakta kvasaca, 10g/l NaCl, pH 7,5) (Difco Luria Broth Base, Miller, BD, Francuska) i srčano-moždani bujon (Brain Heart Infusion, BioRad). Kulture su inkubirane aerobno na 35 °C, a bujonske uz dodatnu agitaciju od 230 rpm.

## 5.3 SEROTIPIZACIJA

Serotip *P. aeruginosa* izolata određen je na svježim (24-satnim) kulturama s krvnog agara metodom aglutinacije na predmetnom staklu uz pomoć komercijalno dostupnih antiseruma podijeljenih u četiri polivalentna seruma koji svaki uključuje četiri monovalentna seruma - PMA (P1, P3, P4, P6); PME (P2, P5, P15, P16); PMC (P9, P10, P13, P14) i PMF (P11, P12, P7, P8) proizvođača BioRad, Francuska. Serotipizacija seronetipabilnih sojeva pokušana je i na prokuhanim stanicama (20 minuta na 100 °C) s prekonoćnim bujonskim kulturama, po preporukama proizvođača.

## **5.4 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE**

### **5.4.1 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE DISK DIFUZIJSKOM METODOM**

Disk difuzijskom metodom na kation usklađenom Mueller-Hinton agaru (BD) s bakterijskim inokulumom 0,5 McFarlanda ( $10^8$  /ml) određena je antimikrobna aktivnost piperacilina (100 µg), piperacilina s tazobaktamom (100/10µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonama (30 µg), imipenema (10 µg), meropenema (10 µg), ciprofloksacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), netilmicina (30 µg), amikacina (30 µg) te kolistina (10 µg). Svi diskovi imali su promjer 6 mm, proizvođača Bio-Rad. Korišteni su standardi izvođenja i interpretacije disk difuzijske metode po CLSI-u (NCCLS).<sup>125</sup>

### **5.4.2 ISPITIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE DILUCIJSKOM METODOM**

#### **5.4.2.1 METODA MIKRODILUCIJE U BUJONU**

Određena je minimalna inhibicijska koncentracija u kation usklađenom Mueller-Hinton bujonu (BD) s bakterijskim inokulumom od  $5 \times 10^4$  za antibiotike: piperacilin (Sigma), piperacilin s tazobaktamom (Wyeth), karbenicilin (Fluka), cefotaksim (USP Rockville, SAD), ceftazidim (Sigma), cefoperazon (Pfizer), cefepim, aztreonam (USP Rockville, SAD), imipenem (MSD), meropenem (Astra Zeneca), ciprofloksacin (USP Rockville, SAD), gentamicin (Sigma), tobramicin (Sigma), netilmicin (Schering Plough), amikacin (USP Rockville, SAD) te kolistin (Sigma).

Raspon koncentracija svih antibiotika bio je od 0,125 do 128 µg/ml, izuzev karbenicilina gdje je raspon koncentracija bio od 1 do 1024 µg/ml. MIK-ovi su interpretirani po standardima CLSI-a.<sup>125</sup>

#### **5.4.2.2 METODA E-TESTA**

Određena je minimalna inhibicijska koncentracija za imipenem (raspon koncentracija 0,1-32 µg/ml) i meropenem (raspon koncentracija 0,1-32 µg/ml) (proizvođač AB BIODISK, Solna, Švedska) na Mueller-Hintonovom kation-usklađenom agaru prema uputama proizvođača. MIK-ov su interpretirani po CLSI standardu.

### **5.5 REZISTOTIPIZACIJA**

Sojevi su radi daljnjih usporedbi prema fenotipu rezistencije kojeg smo nazvali rezistotip podijeljeni u devet skupina označenih rimskim brojevima I-IX. Rezistotip I imali su oni izolati koji su pokazali smanjenju osjetljivost na antibiotike iz skupine ureidopenicilina, cefalosporina (odnosi se na ceftazidim i cefepim za sve skupine), karbapenema, aminoglikozida te fluorokinolona. Rezistotip II imali su izolati koji su pokazivali smanjenu osjetljivost na antibiotike iz skupine ureidopenicilina, cefalosporina, karbapenema i fluorokinolona, a osjetljivost na aminoglikozide. Rezistotip III imali su izolati koji su bili osjetljivi na fluorirane kinolone te otporni na antibiotike iz preostalih skupina. Rezistotip IV označavao je izolate osjetljive na piperacilin i/ili piperacilin s tazobaktamom, izolati rezistotipa V bili su osjetljivi na cefalosporine i to ceftazidim i cefepim, izolati rezistotipa VI bili su osjetljivi na aminoglikozide i fluorokinolone, oni rezistotipa VII na ureidopeniciline i cefalosporine; izolati rezistotipa VIII



bili su osjetljivi na ureidopeniciline, cefalosporine i aminoglikozide, a oni rezistotipa IX još i na fluorokinolone, kako prikazuje Tablica 8.

**Tablica 8 . Karakteristike fenotipova rezistencije ispitivanih sojeva - rezistotipovi.**

<b>Antibiotik/ Rezistotip</b>	<b>Ureidopenicilini</b>	<b>Cefalosporini</b>	<b>Karbapenemi- Imipenem (meropenem)</b>	<b>Aminoglikozidi</b>	<b>Fluorokinoloni</b>
<b>I</b>	R	R	R	R (svi ili samo AN <sup>a</sup> S)	I ili R
<b>II</b>	R	I ili R	R	S	I ili R
<b>III</b>	R	R	R	R (svi ili samo AN S)	S
<b>IV</b>	S	I ili R	R (I ili S)	I ili R	I ili R
<b>V</b>	R	S	R	R (svi ili samo AN S)	I ili R
<b>VI</b>	R	I ili R	R (I ili S)	S	S
<b>VII</b>	S	S	R	R (svi ili samo AN S)	R
<b>VIII</b>	S	S	R	S	R
<b>IX</b>	S	S	R	S	S

<sup>a</sup>amikacin

## 5.6 METODE FENOTIPSE DETEKCIJE MBL

### 5.6.1 EPI (EDTA-PHENANTROLIN-IMIPENEM) MIKRODILUCIJSKA METODA

EPI mikrodilucijska tehnika urađena je po ranije opisanoj metodi.<sup>130</sup> Ukratko, MIK je određen standardnom mikrodilucijskom metodom u bujonu s bakterijskim inokulumom od  $5 \times 10^4$  CFU po jažici. Koncentracija imipenema kretala se od 0,125 do 128  $\mu\text{g/ml}$ . MIK je određen u prisustvu ili odsustvu mješavine 0,4 mM EDTA i 0,04 mM 1,10-fenantrolina u konačnoj koncentraciji. Kontrolni soj bio je *P. aeruginosa* ATCC 27853 (negativna kontrola), odnosno VR-143/97 (pozitivna kontrola). Rezultati su očitani nakon inkubacije od 18 sati. Smanjenje MIK-a za  $\geq 4X$  u prisustvu inhibitora (EDTA) u mikrodilucijskoj metodi ukazivalo je na moguću prisutnost metalo- $\beta$ -laktamaza.

### 5.6.2 E-TEST MBL

E-test za detekciju MBL napravljen je s komercijalno dostupnim trakicama koje na jednoj strani sadržavaju imipenem u rasponu koncentracija 4-256  $\mu\text{g/ml}$ , a na drugoj imipenem s EDTA u rasponu koncentracija 4-64  $\mu\text{g/ml}$  (AB Biodisk, Solna, Švedska), prema uputama proizvođača. Na moguće prisustvo MBL enzima ukazivalo je smanjenje MIK-a za imipenem  $\geq 3 \log_2$  dilucije (odnosno za  $\geq 8X$ ) u prisustvu EDTA, odnosno pojava fantomske zone ili deformacije imipenemske elipse.<sup>131,132</sup>

## **5.7 METODE FENOTIPSKE DETEKCIJE OSTALIH $\beta$ -LAKTAMAZA**

### **5.7.1 DISK DIFUZIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE KISELINE I KLAVULANSKE KISELINE**

#### **5.7.1.1 INHIBICIJA $\beta$ -LAKTAMAZE UPORABOM FENILBORONIČNE KISELINE**

U disk difuzijskoj metodi na Mueller-Hinton agaru postavljeni su na udaljenosti od 2 cm (centar od centra) diskovi ceftazidima, odnosno imipenema pri čemu je na jedan naneseo 20  $\mu$ l fenilboronične kiseline koncentracije 15 mg/ml. Inhibicija se očitovala povećanjem zone inhibicije oko diska za više ili jednako 5 mm, odnosno zonom inhibicije porasta između oba diska.<sup>133</sup>

#### **5.7.1.2 INHIBICIJA $\beta$ -LAKTAMAZE UPORABOM KLAVULANTA**

Nakon inokulacije soja na dvije ploče Mueller-Hintonovog agara postavljen je na sredini svake ploče disk amoksicilina s klavulanskom kiselinom te na udaljenosti 2 cm (centar od centra) od njega diskovi ceftazidima, cefepima i aztreonama.<sup>128</sup> Na jednoj ploči naneseo je na svaki disk 20  $\mu$ l fenilboronične kiseline koncentracije 15 mg/ml.<sup>133</sup> Za negativnu kontrolu korišten je soj *P. aeruginosa* ATCC 27853, a kao pozitivna kontrola *P. aeruginosa* 463/98 (PER-1 pozitivan). Pozitivnim je proglašena pojava fantomske zone (zona inhibicije rasta) između dva diska odnosno deformacija zone inhibicije prema disku klavulanske kiseline.

### **5.7.2 MIKRODILUCIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE KISELINE I KLAVULANSKE KISELINE**

Određena je minimalna inhibicijska koncentracija na ceftazidim u rasponu koncentracija od 0,125-128  $\mu\text{g/ml}$  u prisustvu fenilboronične kiseline konačne koncentracije 300  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>133</sup> Indikativno za inhibiciju bilo je smanjenje MIK-a u prisustvu inhibitora  $\geq 4X$  u odnosu na MIK bez inhibitora. Za sojeve sa značajnim smanjenjem MIK-a u prisustvu fenilboronične kiseline određen je MIK imipenema pod istim uvjetima. Također su određeni MIK-ovi na ceftazidim u prisustvu klavulanata u konačnoj koncentraciji od 2  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>128,134</sup> Kao kontrolni sojevi korišteni su *P. aeruginosa* ATCC 27853 (negativna kontrola) te *P. aeruginosa* 463/98 (PER-1 pozitivan, pozitivna kontrola)

### **5.8 FENOTIPSKE METODE DETEKCIJE POJAČANOG RADA EFLUKSNIH CRPKI**

S obzirom da je karbencilin izvrstan supstrat za tripartitnu proteinsku pumpu OprM-MexAB, za izolate koji su imali odnos MIK za karbencilin>MIK cefotaksima>MIK piperacilina>MIK ceftazidima zaključili smo neizravno da je mogući mehanizam rezistencije na karbapeneme efluks, bez obzira na inhibiciju boroničnom kiselinom. Za izolate kojima je odnos minimalnih inhibicijskih koncentracija bio MIK cefotaksima>MIK karbencilina>MIK ceftazidima isključili smo efluks kao mogući mehanizam rezistencije.<sup>26,33,34</sup>

## **5.9 ENZIMATSKI ESEJI IZ STANIČNIH EKSTRAKATA - AKTIVNOST MBL**

Za ispitivanje aktivnosti metalo- $\beta$ -laktamaze pripremljeni su stanični enzimatski ekstrakti i to kako slijedi. Stanice su inkubirane u Mueller-Hintonovom bujona aerobno na 35 °C uz vrtnju od oko 120 o/min do kasne eksponencijalne faze (oko 4 sata) te istaložene centrifugiranjem na 4500 o/min 10 min na 4 °C. Talog je resuspendiran u 1 ml HEPES pufera, a stanice razbijane sonifikacijom na ledu tri puta tijekom 20 sekundi uz 50 W. Supernatant nakon centrifugiranja na 15,000 o/min tijekom 2 min predstavljao je stanično-proteinski ekstrakt. Supstrat (imipenem, MSD) otopljen je u HEPES puferu do konačne koncentracije od 150  $\mu$ M. U reakcijskoj mješavini od 500  $\mu$ l otopine imipenema i 20  $\mu$ l proteinskog ekstrakta, hidroliza je zabilježena kao konstantan pad vrijednosti absorbance s karakterističnim nagibom konačne krivulje (obično -0,05/min). Inhibicija hidrolize imipenema s EDTA mjerena je rezidualnom aktivnošću karbapenemaze nakon inkubacije proteinskog ekstrakta tijekom 20 minuta na 25 °C u prisutvu 10 mM EDTA. Kontrola bez EDTA služila je kao negativna kontrola.<sup>50</sup>

## **5.10 DETEKCIJA OprD PROTEINA VANJSKE MEMBRANE**

Izolati su inkubirani u Luria Bertoni bujonu preko noći, a ujutro je izmjerena optička gustoća (OD) porasle kulture spektrofotometrom (Spectrophotometer Lambda BIO40, Perkin Elmer) uz program UV WinLab pri 640 nm valne duljine svjetlosti, koja se u uzorcima kretala između 1 i 1,4. Kultura je dvaput koncentrirana centrifugiranjem i isprana resuspendiranjem u puferu HEPES (Sigma)/PMSF (Sigma); pH 7,5. Bakterijske stanice lizirane su ultrazvučnom sondom

(Bandelin Sono pulss UW2200, sonda MS 72, Berlin, Njemačka) 3-4 puta u trajanju od 15 sekundi s pauzama od 1 minute na ledu. Nakon uklanjanja neliziranih stanica, proteini staničnih membrana koncentrirani su centrifugiranjem i resuspendirani u puferu HEPES/PMSF. Nakon inkubacije s 20% otopinom detergenta sarkozila (Sigma) i centrifugiranja, talog je resuspendiran u puferu za lizu HEPES/SDS s merkaptetanolom. Nakon denaturacije proteina kratkim kuhanjem proteini membrana nanoseni su u jažice gela debljine 0,75 mm dimenzije 7x7 cm. Korišten je 4% gel za sabijanje u sastavu akril 0,67 ml, 1,25 M Tris 6,8 3,75 ml, SDS 10% 50 µl, H<sub>2</sub>O 3 ml, TEMED 15 µl, 10% APS (amonij persulfat) 25 µl te 11% gel za odvajanje u sastavu akril 5,5 ml, 1,5 M Tris 8,8 3,75 ml, SDS 10% 150 µl, H<sub>2</sub>O 5,53 ml, TEMED 7,5 µl, 10% APS 75 µl. Elektroforeza je urađena na aparatu Mighty Small II (Hofer Pharmacia Biotech Inc, San Francisco, USA) pri jačini istosmjerne struje 40 mA, u trajanju od 60 min. Istovremeno je nanosena u rubne jažice količina od 5 µl proteinskog markera Molecular Weight Standard Mixture Recombinant (SIGMA M0671), koji jasno razdvaja vrpce veličine 15, 25, 35, 50, 75, 100 i 150 kD na gelu. Nakon elektroforeze gel za separaciju obojan je otopinom 0,025% Comassie Blue R-250 (Sigma) s 40% metanola i 7% octene kiseline te nakon odbojavanja fotografiran kamerom u sklopu konfiguracije GelDoc XR Documentation System (Bio Rad) i obrađen programom Quantity One 1-D Analysis Software (Bio Rad). Očekivana veličina proteina vanjske membrane OprD je 46 kD. Kao kontrolni sojevi korišteni su soj PAO1 (pozitivna kontrola) i TNP065 (negativna kontrola).<sup>27,129</sup>

## 5.11 METODE DETEKCIJE GENA ZA MBL

### 5.11.1 EKSTRAKCIJA DNK

Genomska DNK korištena u PCR reakcijama za detekciju *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>PER</sub>* te *OprD* gena ekstrahirana je metodom lize: kolonije s MH agara resuspendirane su u 500 µl destilirane vode i suspenzija je prokuhana tijekom 10 minuta na 95 °C.

U PCR reakcijama za amplifikaciju integrona korištena je genomska DNK dobijena uporabom InstaGene matrix kita (Bio-Rad) po uputama proizvođača.

Cijela stanična DNK (kromosomska i ekstrakromosomska DNK) korištena u Southern blot analizi ekstrahirana je fenol-kloroformskom ekstrakcijom i precipitacijom s ledenim apsolutnim etanolom.<sup>135</sup> Kvaliteta DNK procijenjena je elektroforezom na 0,75% agaroznom gelu. Čuvana je u destiliranoj vodi na 4 °C.

Ekstrakcija plazmidne DNK iz MBL pozitivnih sojeva urađena je uporabom Plasmid Midi kita (Qiagen).

### 5.11.2 PROBIRNE PCR REAKCIJE

Parovi početnica koji su korišteni u ovom radu prikazuje Tablica 9. PCR reakcije za detekciju gena veličine <1500 bp provedene su u konačnom volumenu od 50 µl koji je sadržavao 20 µl PCR vode (Roche), 25 µl PCR Master Mix-a (Roche), po 1 µl početnice F i R (koncentracije 10 pmol/µl) te 3 µl bakterijske DNK (lizata). Korišten je sljedeći program amplifikacije: inicijalna denaturacija na 94 °C tijekom 1-3 minute; 30-32 ciklusa denaturacije na 94 °C tijekom 40 sekundi, vezanje početnica na odgovarajućoj T<sub>m</sub> tijekom 40 sekundi i produljenje lanca na 70-

72 °C tijekom 40 sekundi; konačno produljenje lanca na 72 °C tijekom 10 minuta, koje je slijedilo hlađenje i čuvanje na 4 °C.<sup>50,70</sup> PCR reakcije izvedene su u uređaju Applied Biosystem Gene Amp PCR system 9700.

PCR produkti nanoseni su u količini od 5 µl u 1% agarozni gel i razdvojeni elektroforezom pri jačini struje od 100 V, uz marker molekularne veličine DNK od 100 parova baza (MWM XIV, Roche).

### **5.11.3 AMPLIFIKACIJA INTEGRONA**

Za PCR reakcije amplifikacije integrona PCR mješavina sadržavala je 2,5 U polimeraze iz Expand High-Fidelity<sup>PLUS</sup> PCR system (Roche) u reakcijskom puferu također definiranom od proizvođača koji je sadržavao 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM deoksinukleozid trifosfata, te 50 pmol svake početnice. Za amplifikaciju integrona korištena je bakterijska DNK u količini od 20 µl supernatanta ekstrakta priređenog InstaGene matrix kitom. Reakcijski parametri bili su: inicijalna denaturacija na 94 °C tijekom 3 minute, 10 ciklusa denaturacije na 94 °C tijekom 25 sekundi, vezanja početnica na 52 °C tijekom 30 sekundi te produljenja lanca na 68 °C tijekom 3 minute i 30 sekundi; potom 25 ciklusa s istim parametrima, s razlikom da se u svakom ciklusu vrijeme produljenja lanca produljivalo 5 sekundi; na kraju konačna ekstenzija na 68 °C tijekom 10 minuta te hlađenje i čuvanje na 4 °C.<sup>50</sup> PCR reakcije izvedene su na uređaju Applied Biosystem Gene Amp PCR system 9700.

PCR amplikoni detektirani su elektroforezom u agaroznom gelu koncentracije 0,8% pri jačini struje 85 V uz marker molekularne veličine DNK od 100 parova baza.



**Tablica 9 . Parovi početnica korišteni u PCR reakcijama u ovom radu.**

Parovi početnica	Cilj	Duljina produkta (bp)	Redoslijed baza (5'to 3')
<b>U amplifikaciji specifičnih gena</b>			
<i>β-laktamaza kodirajući geni</i>			
IMP-DIA/f	<i>bla<sub>IMP</sub> gen</i> <sup>136</sup>	361	GAA-GGY-GTT-TAT-GTT-CAT-AC (Y=C ili T)
IMP-DIA/r			GTA-MGT-TTC-AAG-AGT-GAT-GC (M=A ili C)
VIM-DIA/f	<i>bla<sub>VIM</sub> gen</i> <sup>50</sup>	523	CAGATTGCCGATGGTGTGG
VIM-DIA/r			AGGTGGGCCATTCAGCCAGA
PER/f	<i>bla<sub>PER</sub> gen</i> <sup>137</sup>	966	GGGACARTCSKATGAATGTCA
PER/r			GGYSGCTTAGATAGTGCTGAT
<i>OprD gen vanjske membrane</i>			
D1/f	<i>OprD gen</i> <sup>138</sup>	1416	CGCGGATCCATGCGACATGCGTCATGC
D2/r			CGCGGATCCTTACAGGATCGACAGCGG
<i>EcfX gen P. aeruginosa</i>			
Ecf1	<i>ecfX gen</i> <sup>139</sup>	528	ATGGATGAGCGCTTCCGTG
Ecf2			TCATCCTTCGCCTCCCTG
<b>U amplifikaciji genskog sadržaja integrona</b> <sup>140,141,142</sup>			
INT/5'CS	Gen integreaze tipa I ( <i>intI1</i> )	Varijabilno	CTTCTAGAAAACCGAGGATGC
INT/3'CS	<i>qacEΔ1 gen</i>	Varijabilno	TACTTCGCCAACTATTGCG
Oxa-10 spec F	Gen oksacilinaze (oxa-10 grupa)	Varijabilno	GGAACAAAGAGTTCTCTGCC
Oxa5/10 R			TTAGCCACCAATGATGCCYTC
aacA4-ORF F	Gen za aminoglikozid modificirajući enzim	Varijabilno	ATGACTGAGCATGACCTTCG
aacA4-ORF R			TTAGGCATCACTGCGTGTGTTTC

## 5.12 GENOTIPIZACIJA IZOLATA

### 5.12.1 ELEKTROFOREZA U PULZIRAJUĆEM POLJU

Agarozni blokovi DNK bakterijskih sojeva pripremljeni su po ranije opisanoj metodi<sup>143</sup> i cijepani s *Xba*I enzimom (Fermentas) u količini od 20 U u 200 µl konačnog volumena restrikcijske mješavine. DNK je cijepana restrikcijskom endonukleazom na 37 °C tijekom 3 sata.

Pocijepana DNK razdvojena je elektroforetski u 1,2% agarozu na CHEF-DR III (BioRad) uređaju pri temperaturi od 12 °C uz standard lambda konkatamer (bakteriofag lambda, BioRad) pri sljedećim uvjetima; kut 120 stupnjeva; pulzacije 1. faze 0,5-20 sek. pri voltaži 6V/cm, trajanje 1. faze 19 sati te pulzacije 2. faze 5 do 50 sek. u trajanju od 4 sata<sup>144</sup>.

Gel se po završetku elektroforeze bojava etidijevim bromidom u koncentraciji 0,5 µg/ml i fotografirao Polaroid 667 filmom na UV transiluminatoru pri 254 nm.

DNK profili analizirani su nakon skeniranja fotografija agaroznih gelova kompjuterskim programom GELComparTM (Applied Maths, Koortrijk, Belgija) koji izračunava Diceov koeficijent sličnosti između analiziranih izolata. Na bazi ovog koeficijenta se metodom UPGMA ("unweighted pair group method using arithmetic averages") izradio dendrogram kojim se prikazala srodnost sojeva. Korištena je pozicijska tolerancija od 2%. U slučaju da je sličnost bila  $\geq 80\%$  izolati su se smatrali genetski srodni pa se klonski tip definirao kao skupina izolata s Diceovim koeficijentom sličnosti  $\geq 80\%$ , što bi odgovaralo definiciji "vjerojatno srodni" ("possibly related") po kriterijima Tenovera i suradnika (odnosno razlika od tri do pet

vrpci) i sukladno tome klonski podtip skupina izolata s razlikom od jedne do dvije vrpce na agaroznom gelu, ili koeficijentom sličnosti  $\geq 90\%$ . Genetski istovjetni bili su izolati bez razlika u vrpcama DNK, a genetski nesrodni smatrali su se oni čiji je koeficijent sličnosti bio  $< 80\%$ , odnosno razlika od šest i više vrpce nakon cijepanja s enzimom *XbaI* na skeniranom agaroznom gelu.<sup>145,146</sup>

MBL sojevi pocijepani su i za *Pseudomonas aeruginosa* specifičnijim restrikcijskim enzimom *SpeI* (Invitrogen) u količini od 10 U u konačnom volumenu od 300  $\mu$ l. Restrikcijska endonukleazom *SpeI* cijepana je mikrobna DNK tijekom inkubacije na 37 °C tri sata. Pocijepana DNK razdvojena je elektroforetski u 1% agarozu na CHEF-DR III (BioRad) uređaju pri temperaturi od 12 °C uz standard lambda konkatamer (bakteriofag lambda, BioRad) pri sljedećim uvjetima; kut 120 stupnjeva; pulzacije 1. faze 5-20 sek. pri voltaži 5V/cm, trajanje 1. faze 10 sati te pulzacije 2. faze 5 do 60 sek. u trajanju od 14 sati. Gel se po završetku elektroforeze bojava etidijevim bromidom u koncentraciji 0,5  $\mu$ g/ml i fotografirao Polaroid 667 filmom na UV transiluminatoru pri 254 nm.

### **5.12.2 RAPD - POLIMORFIZAM NASUMCE UMNOŽENE DNK**

Metoda RAPD (random amplified polymorphic DNA), opisana izvorno od strane Mahenthiralingam i suradnika<sup>147</sup> te Campbell i suradnika<sup>148</sup>, uz pomoć početnica 208 (5'-ACGGCCGACC) i 272 (5'-AGCGGGCCAA), prilagođenih *P. aeruginosa* korištena je za dodatnu tipizaciju MBL pozitivnih izolata. RAPD profil uspoređen je vizualno te interpretiran po kriterijima Tenovera i suradnika.

## 5.13 DETEKCIJA SMJEŠTAJA GENA ZA MBL

### 5.13.1 ODREĐIVANJE LOKALIZACIJE *bla<sub>VIM</sub>* GENA

#### 5.13.1.1 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNK

Ekstrakcija plazmidne DNK urađena je uz pomoć komercijalno dostupnog Qiagen Midi kita, po uputama proizvođača te nakon toga analizirana elektroforetski u 0,8% agarozu u TBE puferu. Nakon bojanja s etidij bromidom, vizualizirana je DNK UV svjetlom. Kao pozitivna kontrola korišten je soj NTCC 50192 *E. coli* poznate molekularne veličine plazmida od 148, 64, 36 i 7 kb.<sup>149</sup>

#### 5.13.1.2 SOUTHERN BLOTTING

Ekstrahirana DNK nanescna je na gel u različitim koncentracijama – 1 mmol/μl, 100 pmol/μl i 10 pmol/μl) i analizirana elektroforetski u 0,75% agarozu tijekom 4 sata pri 40 V. Nakon bojanja etidij bromidom, gel je stavljen u denaturirajuću otopinu te nakon neutralizacije položen na Whatmannov filter papir i vakuumom osušen tijekom 60 min na 60 °C.<sup>144</sup>

Sasušeni gel je hibridiziran s VIM PCR-amplikonom koji je sadržavao cijeli *bla<sub>VIM</sub>* kodirajući dio *P. aeruginosa* VR-143/97.<sup>50</sup> Amplikon je obilježen Redivue <sup>32</sup>P dCTP po slučajnom principu komercijalnim kitom (Rediprime II Random Prime Labelling System Protocol, Amersham Biosciences Freiburg, Njemačka). Hibridizacija se odvijala preko noći na 60 °C, a detekcija na rendgenskom filmu tijekom 12-16 sati na -70 °C.<sup>144,150</sup>

## 5.14 SEKVENCIRANJE

PCR produkti pročišćeni su kitom za purifikaciju (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Njemačka), a slijed nukleotida u PCR produktima određen je u DNK servisu Instituta Ruđer Bošković na četverokapilarnom ABI 3100 DNK sekvenatoru.

Kompjuterska analiza redoslijeda sekvenciranih nukleotida (baza) provedena je uz pomoć programa BioEdit verzija 7.0.9. (Ibis Biosciences) i dostupnih nukleotidnih online baza podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

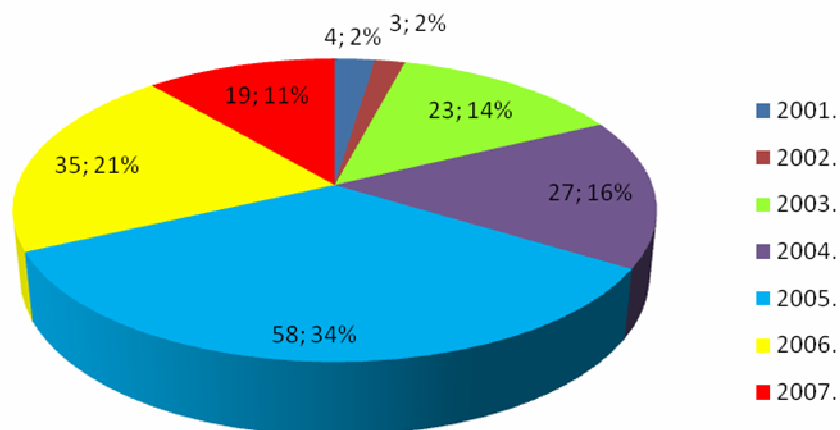
## 5.15 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U analizi podudarnosti metoda određivanja osjetljivosti bakterija koristio se Wilcoxonov test usklađenih parova za zavisne uzorke, a za korelaciju rezultata različitih metoda Pearsonov koeficijent korelacije. U testiranju razlike učestalosti pojedinih varijabli kod određenih skupina bolesnika koristio se hi-kvadrat test te za analizu utjecaja pojedinih varijabli na učestalost određenog rezistotipa, odnosno utjecaja izolacije određenog rezistotipa i drugih varijabli na konačan ishod ili duljinu liječenja hi-kvadrat i Mann-Whitneyev test. Analiza je urađena uz pomoć računalnog programa STATISTICA 6, PC Software (StatSoft, Tulsa, OK). Rezultati su interpretirani na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

## 6 REZULTATI

### 6.1 ZBIRKA IZOLATA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

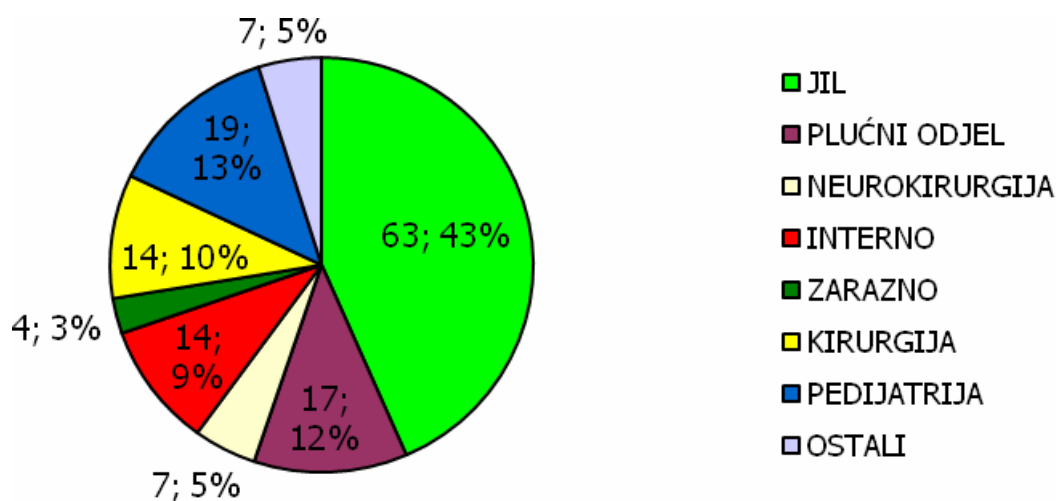
Ukupno je za istraživanje prikupljeno 169 izolata. Najveći broj sojeva prikupljen je 2005. godine - njih 58, odnosno 34%, zatim 2006. godine 35, odnosno 21%. Slijedile su zatim po broju prikupljenih izolata 2003. i 2004. godina s po 23 (14%), odnosno 27 (16%) sojeva. U 2007. godini prikupljeno je 19 (11%) izolata *P. aeruginosa* otpornih na karbapeneme te je zbirci priključeno još 7 izolata prikupljenih u 2001. i 2002. godini. Raspodjelu izolata po godinama prikazuje slika 7.



*Slika 7. Raspodjela prikupljenih izolata Pseudomonas aeruginosa po godinama praćenja.*

## 6.2 OPĆE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA KOJIMA SU PRIPADALI IZOLATI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Izolati *Pseudomonas aeruginosa* koji su analizirani u ovom radu na prisustvo metalo- $\beta$ -laktamaza pripadali su ukupno 145 bolesnika, od kojih je njih devetnaest bilo hospitalizirano u Klinici za dječje bolesti, a 126 u ostalim Klinikama i Odjelima, kao što prikazuje slika 8. Jedinice intenzivnog liječenja (JIL) uključivale su JIL na lokaciji Firule i lokaciji Križine, kirurški JIL, neurokirurški JIL i psihijatrijski JIL. Pedijatrijski JIL prikazan je pod Pedijatrija. Ostali odjeli uključivali su ORL, neurološki i onkološki odjel.



*Slika 8. Raspodjela bolesnika iz čijih su uzoraka analizirani izolati Pseudomonas aeruginosa po odjelima i klinikama.*

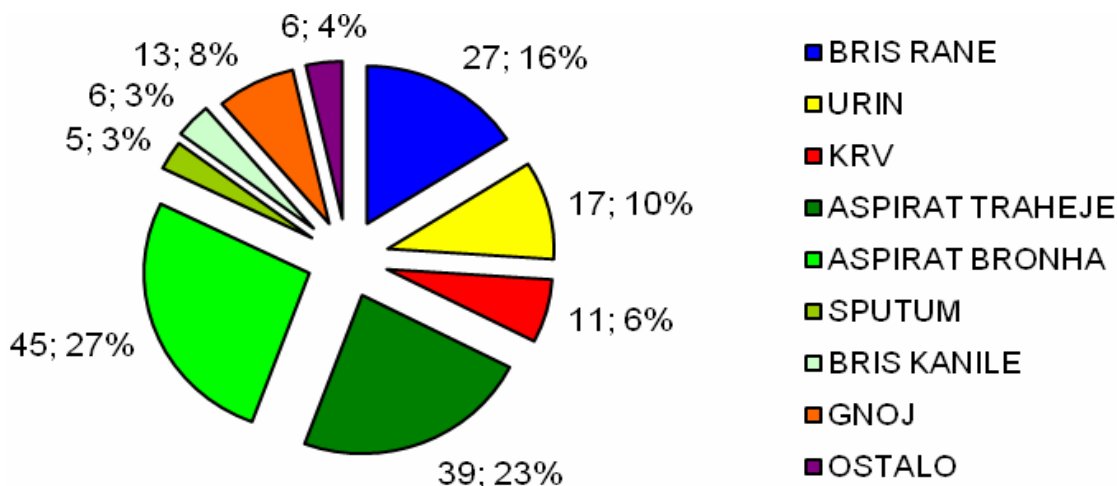
Medijan dobi svih bolesnika bio je 59 godina (8 dana - 85 godina). Prosječna dob pedijatrijskih bolesnika bila je  $3,6 \pm 1,2$  godine (medijan 6 mjeseci; raspon 8 dana do 18 godina), pri čemu je osam bolesnika (42,1%) bilo ženskog, a jedanaest (57,9%) muškog spola. Od 126 odraslih bolesnika, njih 80 (63,5%) bilo je muškog, a 46 (26,5%) ženskog spola.

Medijan dobi odraslih bolesnika bio je 65 godina (18-85). Medijan dobi muških bolesnika bio je 65 godina (19-84), a ženskih također 65 godina (18-85).

Većina uzoraka iz kojih su izolirani sojevi pseudomonasa otporni na karbapeneme bila je iz dišnih putova, njih 95 od 169 (56,2%), a uključivala je aspirate traheje, aspirate bronha, sputume i briseve kanile, kao što prikazuje slika 9. Drugi po učestalosti bili su uzorci briseva rana koji su sačinjavali 16% sveukupnih uzoraka, a zatim su slijedili uzorci urina (17; 10%), gnojevi s 13 uzoraka (8%) koji su uključivali punktate i aspirate rana, te drenažne sadržaje iz prsišta ili abdomena, uzorci krvi (11; 7%) te mali broj ostalih uzoraka (koje su sačinjavali pojedinačni brisevi iz gornjih dišnih putova).

Pedijatrijski bolesnici većinom su kao osnovnu dijagnozu imali kroničnu bolest organskog sustava (njih 17 od 19; uglavnom se radilo o encefalopatiji s retardacijom u 13 bolesnika, ostali su imali kroničnu bolest gastrointestinalnog sustava, a dvoje djece bilo je nedozrelo). Akutna upala pluća i akutna uroinfekcija zabilježeni su u preostala dva djeteta. U trenutku slanja uzroka za mikrobiološku analizu iz kojeg je izoliran soj pseudomonasa otporan na karbapeneme njih 13 imalo je osnovnu dijagnozu akutne upale pluća, četiri sepse, a dvoje djece imalo je akutnu postoperativnu komplikaciju.



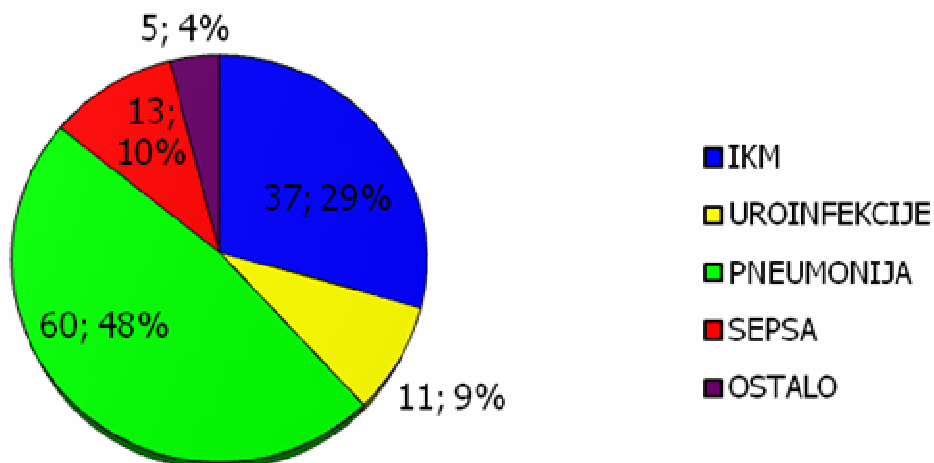


**Slika 9. Uzorci bolesnika iz kojih su izolirani sojevi *Pseudomonas aeruginosa* analizirani u ovom radu.**

U odraslih bolesnika gotovo je polovica njih imala kao osnovnu dijagnozu kroničnu bolest (60 od 126), a 66 akutno stanje. Od kroničnih dijagnoza najčešće se radilo o malignoj bolesti (36,6%), kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti (26,7%) te kardiovaskularnoj i neurološkoj bolesti (16,7%). Ostalo su bile dijagnoze vezane za kronične bolesti gastrointestinalnog i urogenitalnog sustava. Najčešća dijagnoza akutnog stanja bila je traumatska povreda koštanog sustava, potom su po učestalosti slijedili akutni vaskularni incidenti, akutna upala pluća te akutna intraabdominalna upala.

Dijagnoze bolesnika povezane s uzorcima, tj. osnovne dijagnoze zbog kojih su slani uzorci odraslih bolesnika na mikrobiološku pretragu, prikazuje slika 10. Najveći broj uzoraka koji su

poslani na mikrobiološku obradu bio je vezan uz infekcije dišnog sustava (60; 48%) iza čega su bile infekcije kože tj. kirurškog mjesta (IKM).



*Slika 10. Dijagnoze vezane za uzorak iz kojeg je izoliran Pseudomonas aeruginosa u odraslih bolesnika.*

### **6.3 SEROTIPIZACIJA PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Od ukupno 169 sojeva, za njih 151, odnosno 89,4% pouzdano je određen serotip, dok to nije bilo moguće za preostalih 18 izolata (10,65%). Najveći broj izolata, njih 99 (58,6% od ukupnog broja izolata, odnosno 65,6% od ukupnog broja tipabilnih izolata), imalo je serotip O12 te potom serotip O11 (29 izolata; 17,1% od ukupnog broja te 19,2% od ukupnog broja tipabilnih

sojeva). Po učestalosti su zatim bili zastupljeni serotipovi O1 (7; 4,1%), O3 (4; 2,4%) te O5 (3; 1,8%). Serotipovi O6, O8 i O10 bili su sporadično prisutni, dok serotipovi O2, O7, O9 i O15 nisu bili prisutni u analiziranim izolatima, kao što prikazuje Tablica 10. Dva indeks metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivna soja *P. aeruginosa*, indeks soj 1 i indeks soj 2 bili su seronetipabilni.

**Tablica 10. Distribucija izolata *P. aeruginosa* po serotipovima.**

Serotip	Broj	%
O1	7	4,1
O3	4	2,4
O4	2	1,2
O5	3	1,8
O6	1	0,6
O8	1	0,6
O10	1	0,6
O11	29	17,1
O12	99	58,6
O13	1	0,6
O14	1	0,6
O16	2	1,2
UKUPNO TIPABILNI	151	89,4
NETIPABILNI	18	10,6
SVEUKUPNO	169	100

## **6.4 OSJETLJIVOST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NA ANTIBIOTIKE**

Osjetljivost na antibiotike izolata *P. aeruginosa* ispitana je disk difuzijskom metodom, metodom mikrodilucije u bujonu te za karbapenemske antibiotike i metodom E-testa. Prema medijanima vrijednosti zone inhibicije u disk difuzijskoj metodi, najučinkovitiji antibiotici prema izolatima iz studije bili su aztreonam (22 mm), amikacin (18 mm) i kolistin (15 mm). Medijani zona inhibicije za ceftazidim, cefepim i ciprofloksacin nalazili su se u rasponu umjereno osjetljivih, dok su za piperacilin, piperacilin s tazobaktamom, cefoperazon, gentamicin, tobramicin i netilmicin bili u rasponu rezistentnih.

Po postotku osjetljivih izolata najučinkovitiji antibiotici prema testiranim izolatima i disk difuzijskoj metodi bili su kolistin (95,7% osjetljivih), amikacin (62,1%) i aztreonam (57,4%), a slijedili su ih ceftazidim i cefepim s oko 46% osjetljivih izolata. U mikrodilucijskoj metodi medijani vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija bili su u rasponu osjetljivih koncentracija samo za amikacin (4 µg/ml) i ciprofloksacin (4 µg/ml). Za iste antibiotike MIC<sub>50</sub> odgovarao je interpretaciji osjetljiv. U području koncentracija koje se interpretiraju kao umjereno osjetljive nalazili su se MIK-ovi ceftazidima, cefepima i kolistina, kao što detaljno prikazuje Tablica 11. Po postotku osjetljivih izolata, najučinkovitiji antibiotik bio je u mikrodilucijskoj metodi amikacin (82,8%), zatim kolistin (50,8%) i ceftazidim (30,8%).

**Tablica 11. Usporedba učinkovitosti i potencije testiranih antibiotika prema izolatima *Pseudomonas aeruginosa* u disk difuzijskoj i mikrodilucijskoj metodi.**

<b>Antibiotik</b>	<b>Raspon zona (medijan)</b>	<b>% osjetljivih izolata</b>	<b>Raspon MIK-ova (medijan)</b>	<b>% osjetljivih izolata</b>	<b>MIK<sub>50</sub></b>	<b>MIK<sub>90</sub></b>
PIPERACILIN	0-30 (0)	25,0	2->128 (>128)	28,4	>128	>128
PIP/TAZOBAKTAM	0-30 (14)	33,1	2->128 (128)	28,4	128	>128
CEFTAZIDIM	0-30 (17)	46,1	2->128 (16)	30,8	16	64
CEFOPERAZON	0-30 (10)	18,3	8->128 (>128)	5,9	>128	>128
CEFEPIM	0-30 (17)	46,7	2->128 (16)	24,8	16	128
AZTREONAM	0-30 (22)	57,4	4->128 (16)	25,4	16	64
IMIPENEM	0-16 (10)	5,4	16->128 (16)	0	16	32
MEROPENEM	0-24 (10)	9,6	4->128 (32)	4,2	32	32
AMIKACIN	0-30 (18)	62,1	0,5->128 (4)	82,8	4	32
NETILMICIN	0-24 (0)	18,4	1->128 (>128)	17,3	>128	>128
TOBRAMICIN	0-30 (0)	18,3	0,5->128 (64)	18,9	64	128
GENTAMICIN	0-25 (0)	16,6	0,25->128 (64)	16,0	64	>128
CIPROFLOKSACIN	0-30 (18)	36,6	0,125-64 (4)	26,8	4	32
KOLISTIN	0-22 (15)	95,7	0,5-64 (4)	50,8	4	8
Karbenicilin*			16->1028 (>1028)	8,9	>1024	>1024

\*karbenicilin je testiran radi interpretacije mehanizama rezistencije

## **6.5 USPOREDBA REZULTATA TESTIRANJA OSJETLJIVOSTI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RAZLIČITIM LABORATORIJSKIM METODAMA**

### **6.5.1 KORELACIJA DISK DIFUZIJSKE I MIKRODILUCIJSKE METODE**

S obzirom na različitost rezultata dobivenih disk difuzijskom i dilucijskim metodama, statistički su obrađeni podaci dobiveni uporabom ovih metoda. Korelacijom veličine zone inhibicije u mm i minimalne inhibicijske koncentracije u  $\mu\text{g/ml}$  za svaki pojedini antibiotik na razini statističke značajnosti  $p < 0,05$  može se zaključiti da rezultati dobijeni disk difuzijskom metodom značajno koreliraju s rezultatima dobijenim mikrodilucijskom metodom za sve antibiotike osim imipenema, bilo da se radi o standardnoj mikrodiluciji u bujonu ili agar diluciji, odnosno E-testu, kao što prikazuje Tablica 12.

Prihvatljivo visoki Pearsonov koeficijent korelacije ( $>0,7$  ili  $<-0,7$ ) može se uočiti samo za nekoliko antibiotika i to: iz skupine  $\beta$ -laktama samo za piperacilin, iz skupine aminoglikozida za netilmicin te jedino testirani od fluoriranih kinolona, ciprofloksacin.

Nadalje, budući da je osjetljivost na karbapeneme testirana trima metodama, korelirani su rezultati upotrebljenih metoda u testiranju osjetljivosti *P. aeruginosa* na imipenem i meropenem. Kao što se vidi iz Tablice 13, na razini značajnosti  $p < 0,05$  može se utvrditi da za imipenem ne postoji statistički značajna korelacija među rezultatima testiranja osjetljivosti *Pseudomonas aeruginosa* disk difuzijskom metodom u odnosu na mikrodilucijsku metodu i E-test.

Pri testiranju meropenema rezultati dobijeni disk difuzijskom metodom značajno koreliraju s rezultatima dobijenima mikrodilucijskom metodom i E-testom.

Rezultati mikrodilucijske metode u bujonu i E-testa značajno koreliraju za oba testirana karbapenemska antibiotika.

**Tablica 12. Korelacija rezultata testiranja osjetljivosti na antibiotike *Pseudomonas aeruginosa* disk difuzijskom metodom (veličina zone inhibicije u mm) prema mikrodilucijskoj metodi (minimalna inhibicijska koncentracija u µg/ml).**

<b>Antibiotik</b>	<b>Pearsonov koeficijent korelacije</b>	<b>p</b>
PIPERACILIN	-0,878	<0,001
PIPERACILIN+TAZOKTAM	-0,559	<0,001
CEFTAZIDIM	-0,359	<0,001
CEFOPERAZON	-0,662	<0,001
CEFEPIM	-0,191	0,013
AZTREONAM	-0,479	<0,001
<b>IMIPENEM</b>	<b>-0,109</b>	<b>0,163</b>
<b>IMIPENEM (E-test)</b>	<b>-0,139</b>	<b>0,075</b>
MEROPENEM	-0,196	0,011
MEROPENEM (E-test)	-0,448	<0,001
GENTAMICIN	-0,478	<0,001
TOBRAMICIN	-0,466	<0,001
NETILMICIN	-0,759	<0,001
AMIKACIN	-0,397	<0,001
CIPROFLOKSACIN	-0,744	<0,001
KOLISTIN	-0,496	<0,001

**Tablica 13. Korelacija rezultata tri metode u testiranju osjetljivosti *Pseudomonas aeruginosa* na imipenem i meropenem.**

Vrijednosti su izražene Pearsonovim koeficijentom korelacije.

Antibiotik/ Metoda	Disk difuzija (mm)	p	Bujon mikrodilucija (MIK)	p	E-test (MIK)	p
<b>Imipenem</b>						
Disk difuzija (mm)	1		-0,109	0,163	-0,139	0,07
E-test (MIK)	-0,139	0,08	0,190	0,01	1	
<b>Meropenem</b>						
Disk difuzija (mm)	1		-0,196	0,01	-0,448	<0,001
E-test (MIK)	-0,448	<0,001	0,269	<0,001	1	

### 6.5.2 PODUDARNOST DISK DIFUZIJSKE I MIKRODILUCIJSKE METODE

Wilcoxonovim testom usklađenih parova analizirana je podudarnost interpretacijskih kategorija u disk difuzijskoj i dilucijskim metodama, dakle kategorije osjetljiv, umjereno osjetljiv i otporan. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u interpretaciji rezultata disk difuzijske metode u odnosu na mikrodilucijsku metodu i to za većinu testiranih antibiotika: cefoperazon, ceftazidim, cefepim, aztreonam, imipenem, amikacin, ciprofloksacin i kolistin, kao što prikazuje Tablica 14. Statistički nije bilo značajne razlike u podudarnosti interpretacija za piperacilin, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, gentamicin, tobramicin i netilmicin. Najveći broj "vrlo velikih grešaka" (>5%) zabilježen je kod ceftazidima, cefoperazona,



imipenema, meropenema i kolistina (soj se proglasio osjetljivim u disk difuzijskoj metodi, a u stvari je otporan). "Velika greška" zabilježena je najčešće u testiranju ceftazidima, piperacilina, piperacilina s tazobaktamom te amikacina (soj se proglasio otporan, a u stvari je osjetljiv). Najveća podudarnost bila je u interpretaciji obiju metoda za tobramicin.

Najmanji broj podudarnih interpretacija dobijen je pri testiranju cefepima, aztreonama i kolistina i to uglavnom zbog velikog broja "malih grešaka".

## **6.6 REZISTOTIPIZACIJA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Od ukupno 169 sojeva ispitanih za prisustvo MBL, njih 84, odnosno 49,7% imalo je rezistotip I, odnosno bilo je otporno na najmanje jedan iz pet skupina testiranih antibiotika tj. ureidopenicilina, cefalosporina, karbapenema, aminoglikozida i fluorokinolona.

Drugi po učestalosti bio je rezistotip V, odnosno 22 izolata bilo je osjetljivo samo na cefalosporine (13%). Sljedeća po učestalosti bila je grupa sojeva s izoliranom rezistencijom na karbapeneme (16; 9,5%). Raspodjelu izoliranih sojeva po rezistotipu prikazuje Tablica 15.

**Tablica 14. Podudarnost interpretacije rezultata disk difuzijske metode i metode mikrodilucije u bujonu u testiranju osjetljivosti *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike (za karbapeneme uspoređeni su rezultati i E-testa).**

<b>Antibiotik</b>	<b>Podudarne interpretacije N (%)</b>	<b>Vrlo velika greška N (%)</b>	<b>Velika greška N (%)</b>	<b>Mala greška N (%)</b>	<b>z</b>	<b>p</b>
PIPERACILIN	155 (91,7)	4 (2,3)	10 (5,9)	/	1,9	0,059
PIPERACILIN+ TAZOBAKTAM	150 (88,8)	8 (4,7)	11 (6,5)	/	0,7	0,470
CEFTAZIDIM	97 (57,4)	19 (11,2)	10 (5,9)	43 (25,4)	2,9	0,004
CEFOPERAZON	134 (79,2)	16 (9,5)	/	19 (11,2)	5,2	<0,001
CEFEPIM	76 (44,9)	15 (8,9)	4 (2,4)	74 (43,8)	3,4	<0,001
AZTREONAM	84 (49,7)	2 (1,2)	16 (9,5)	67 (39,6)	6,4	<0,001
IMIPENEM	110 (65)	9 (5,4)	/	50 (29,6)	3,2	0,001
IMIPENEM E-test	119 (70,3)	9 (5,4)	/	41 (24,3)	4,9	<0,001
MEROPENEM	133 (78,6)	9 (5,4)	2 (1,2)	25 (14,8)	1,8	0,072
MEROPENEM E- test	132 (78,1)	3 (1,8)	1 (0,6)	33 (19,5)	1,1	0,266
GENTAMICIN	152 (89,9)	4 (2,4)	4 (2,4)	9 (5,3)	0,6	0,542
TOBRAMICIN	163 (96,4)	2 (1,2)	2 (1,2)	2 (1,2)	0,3	0,746
NETILMICIN	154 (91,1)	6 (3,6)	3 (1,8)	6 (3,5)	0,9	0,380
AMIKACIN	113 (66,9)	1 (0,6)	22 (13,0)	33 (19,5)	6,1	<0,001
CIPROFLOKSACIN	105 (62,2)	8 (4,7)	2 (1,2)	49 (31,9)	4,7	<0,001
KOLISTIN	82 (50,0)	22 (13,4)	2 (1,2)	63 (37,3)	7,1	<0,001

*Tablica 15. Raspodjela rezistotipova u testiranih izolata.*

<b>Rezistotip</b>	<b>Broj sojeva</b>	<b>%</b>
I	84	49,7
II	11	6,5
III	9	5,3
IV	12	7,1
V	22	13,0
VI	2	1,2
VII	2	1,2
VIII	11	6,5
IX	16	9,5
Ukupno	169	100

Multiplorezistentni sojevi, tj. oni sojevi koji pokazuju rezistenciju na bilo koji antibiotik iz 3 i više skupine antibiotika od sljedećih skupina: ureidopenicilini, cefalosporini, aminoglikozidi, karbapenemi i fluorirani kinoloni pripadali su skupinama od I-V, a bilo ih je ukupno 138 (81,7%).

S obzirom na tako veliki broj multiplorezistentnih sojeva, u osnovnim usporedbama komparirani su sojevi koji su imali rezistotip I u odnosu na sojeve drugog rezistotipa.

Većina sojeva rezistotipa I pripadala je serotipu O12, njih 64 (42,4% svih tipiziranih sojeva, odnosno 64,6% svih O12 izolata). Drugi po učestalosti među serotipovima, serotip O11,

također su pretežito sačinjavali sojevi rezistotipa I (16 od 29; 55,2%), ali su gotovo podjednako bili zastupljeni i drugi rezistotipovi. Raspodjelu serotipova u odnosu na rezistotipove pokazuje tablica 16.

**Tablica 16. Raspodjela rezistotipova po serotipovima.**

<b>Rezistotip/ Serotip</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>Ukupno Broj (%)</b>
O1	1			1	5					7 (4,6)
O3	1				2				1	4 (2,6)
O4				1			1			2 (1,3)
O5	1		1		1					3 (2,0)
O6		1								1 (0,7)
O8					1					1 (0,7)
O10					1					1 (0,7)
O11	12	1		4	3			2	7	29 (19,2)
O12	64	5	8	3	4	1	1	7	6	99 (65,6)
O13	1									1 (0,7)
O14	1									1 (0,7)
O16	1							1		2 (1,3)
Ukupno serotipizirani										151 (100)
Neserotipizirani	2	4	0	3	5	1	0	1	2	18
Sveukupno izolata	84	11	9	12	22	2	2	11	14	169

## **6.7 FENOTIPSKA DETEKCIJA MBL**

### **6.7.1 EPI MIKRODILUCIJSKA METODA**

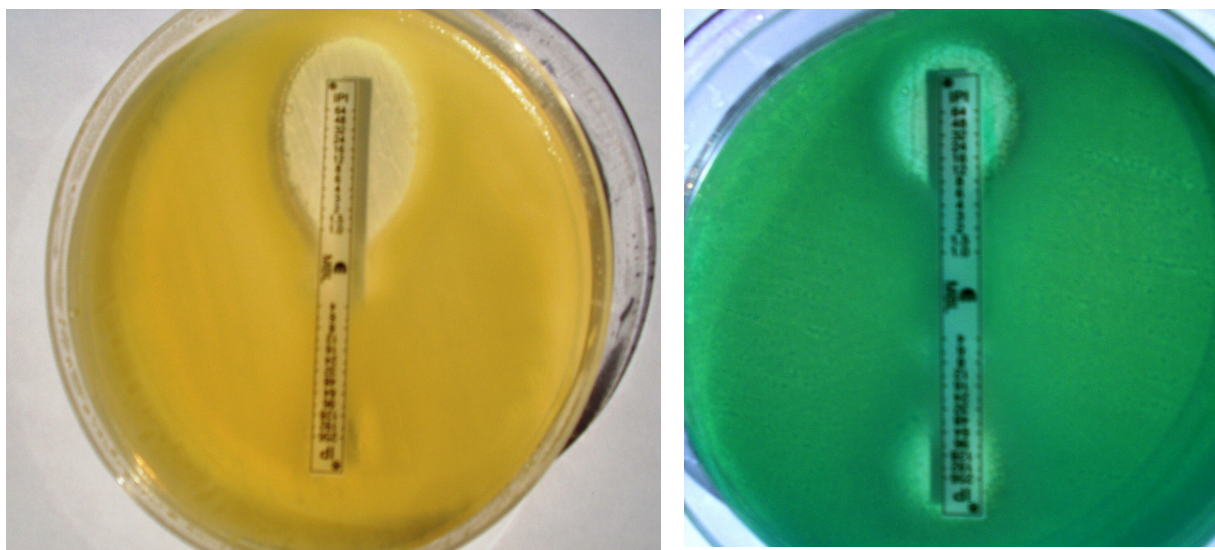
Dodatak EDTA i fenantrolina imipenemu u mikrodilucijskoj metodi rezultirao je smanjenjem MIK-a na imipenem u rasponu od 1X (bez promjene MIK-a) do 64X (medijan 2X). Medijan minimalnih inhibicijskih koncentracija na imipenem s EDTA i fenantrolinom bio je 8 µg/ml (medijan minimalnih inhibicijskih koncentracija za sami imipenem bio je 16 µg/ml). U 12 izolata došlo je do značajnog smanjenja MIK-a imipenema u prisustvu inhibitora ( $\geq 4X$ ), pri čemu su izolati pod rednim brojevima 3, 4, 5, 6, 43 i 178 pokazali izrazito smanjenje minimalne inhibicijske koncentracije na imipenem u prisustvu EDTA za  $\geq 16X$ , kao što prikazuje Tablica 17.

### **6.7.2 E-test MBL**

Za izolate koji su u mikrodilucijskoj metodi pokazali značajno smanjenje MIK-a na imipenem u prisustvu EDTA od  $\geq 4X$  napravljen je i MBL E-test. U MBL E-testu samo je šest izolata (sojevi 3, 4, 5, 6, 43 i 178) pokazalo smanjenje MIK-a imipenema u prisustvu EDTA za  $> 8X$ , odnosno povećanje zone inhibicije na strani trakice E-testa na kojoj je imipenemu dodana EDTA, kao što prikazuje slika 11.

*Tablica 17. Minimalne inhibicijske koncentracije za imipenem u prisustvu EDTA i fenantrolina za izolate s najjačim učinkom inhibitora.*

<b>Izolat</b>	<b>MIK imipenem</b>	<b>MIK imipenem + EDTA + fenantrolin</b>	<b>Smanjenje MIK-a u prisustvu inhibitora (X)</b>
3	128	8	16
4	>128	4	>32
5	>128	4	>32
6	>128	4	>32
43	128	4	32
178	128	8	16
Indeks soj 1	>128	0,125	>1024
Indeks soj 2	>128	0,125	>1024



**Slika 11. E-test MBL za dokaz metalo  $\beta$ -laktamaza.**

Vidljivo je izrazito smanjenje MIK-a za imipenem uz dodatak EDTA (IPI) u odnosu na MIK za imipenem (IP), odnosno povećanje zone inhibicije na trakici E-testa na strani imipenema s inhibitorom.

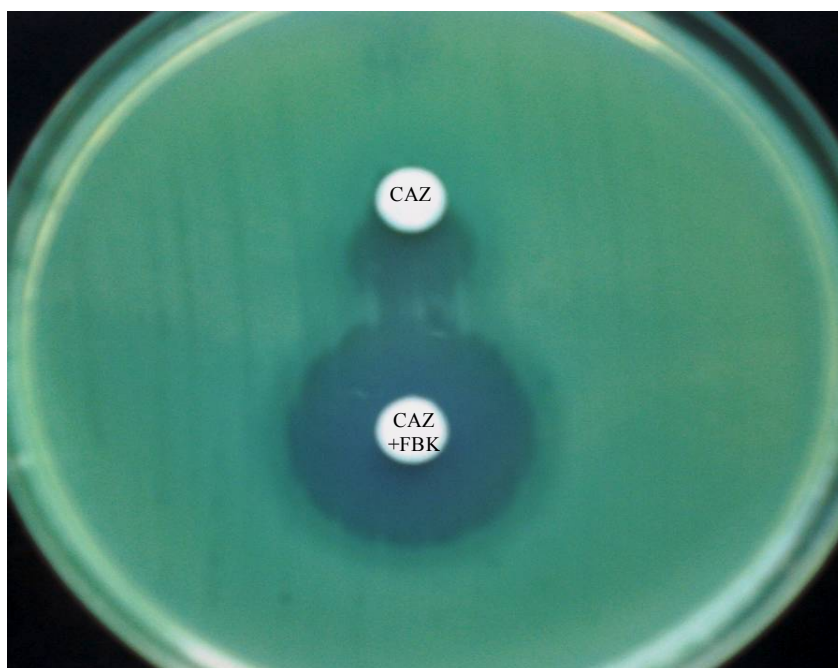
(Slika lijevo VIM-2 pozitivni indeks soj 2, MIK za imipenem  $>256 \mu\text{g/ml}$ , MIK za imipenem+EDTA  $<1 \mu\text{g/ml}$ ; slika desno soj 3, MIK za imipenem  $128 \mu\text{g/ml}$ , MIK za imipenem+EDTA  $8 \mu\text{g/ml}$ )

## **6.8 FENOTIPSKA DETEKCIJA OSTALIH $\beta$ -LAKTAMAZA**

### **6.8.1 DISK DIFUZIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE KISELINE I KLAVULANSKE KISELINE**

#### **6.8.1.1 INHIBICIJA FENILBORONIČNOM KISELINOM**

Dodatkom fenilboronične kiseline (FBK) disku ceftazidima došlo je u 104 soja (59,7%) do značajnog povećanja zone inhibicije oko diska ceftazidima, kao što prikazuje slika 12.

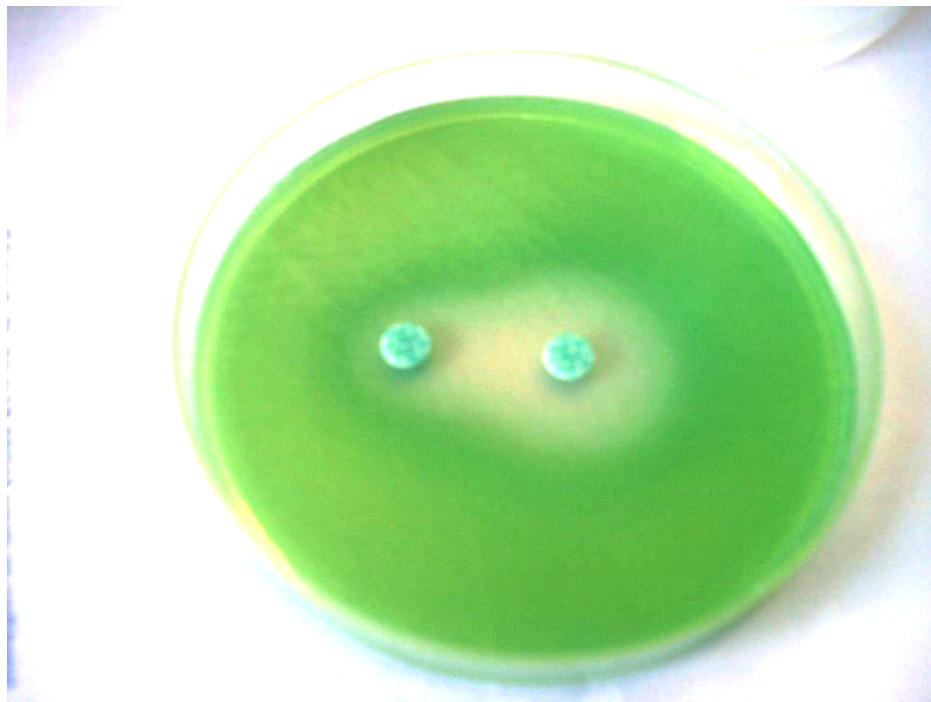


***Slika 12. Usporedba zona inhibicije oko diska ceftazidima (CAZ; 6 mm) i diska ceftazidima s dodatkom fenilboronične kiseline (CAZ+FBK; 24 mm) .***

*Vidljiva je i fantomska zona između diskova zbog difuzije fenilboronične kiseline prema disku ceftazidima.*

Sličan učinak fenilboronične kiseline u ovih je spojeva opažen i u metodi dvostrukog diska koristeći disk imipenema, kao što prikazuje slika 13.



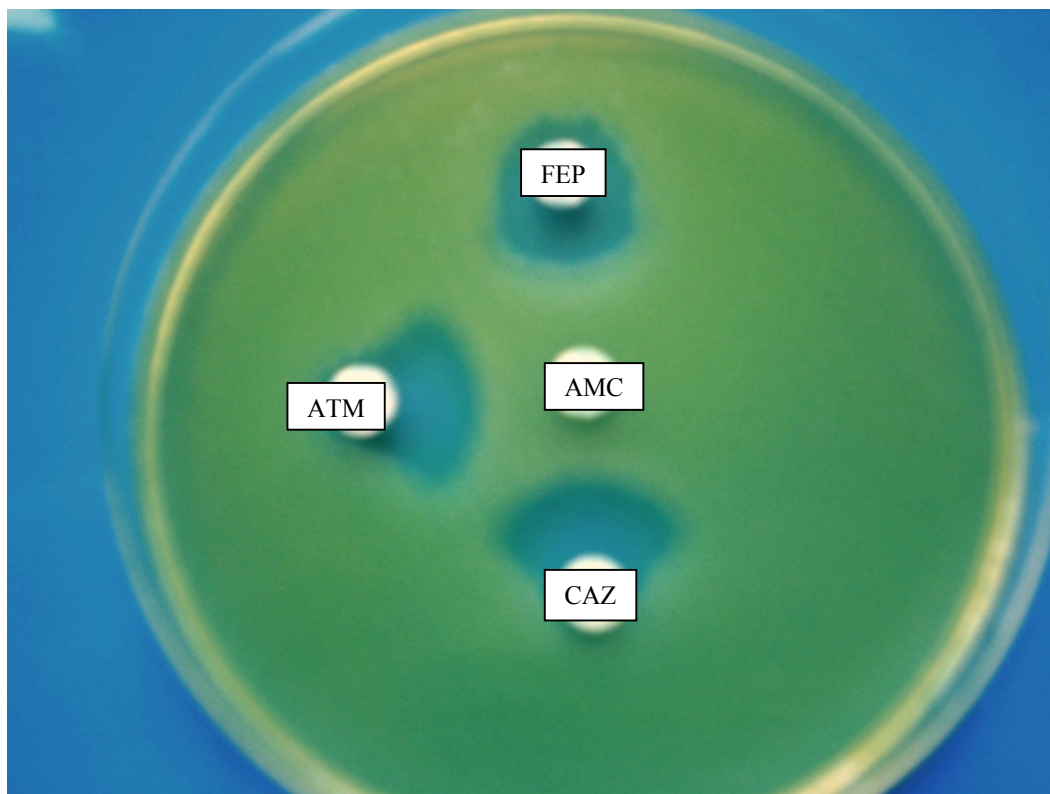


**Slika 13. Učinak fenilboronične kiseline na veličinu zone inhibicije oko diska imipenema za izolat br. 106.**

Lijevo je disk imipenema; zona oko diska je 12 mm, a desno disk imipenema na koji je nakapana fenilboronična kiselina; zona oko diska je 28 mm.

#### **6.8.1.2 INHIBICIJA KLAVULANSKOM KISELINOM**

U disk difuzijskoj metodi ni za jedan soj nije opaženo povećanje zone inhibicije ili deformacije iste, odnosno pojava fantomske zone u prisustvu diska s klavulanskom kiselinom, bez obzira na uporabu fenilboronične kiseline. Samo se pri testiranju pozitivne kontrole, tj soja *P. aeruginosa* PER-1 463/98 mogla opaziti deformacija zone inhibicije prema disku s klavulanskom kiselinom i to oko diskova ceftazidima, cefepima i aztreonama, a nakon dodatka fenilboronične kiseline, kao što prikazuje Slika 14.



***Slika 14. Metoda sinergije dvostrukog diska u detekciji  $\beta$ -laktamaza inhibiranih klavulanskom kiselinom uporabom fenilboronične kiseline nakapane na svaki disk.***

*Deformacija zone inhibicije za cefepim (FEP), aztreonam (ATM) i ceftazidim (CAZ) prema disku amoksicilina s klavulanskom kiselinom (AMC) u sredini (Soj 463/98, PER-1 pozitivan soj; pozitivna kontrola)*

### **6.8.2 MIKRODILUCIJSKA METODA UZ UPORABU INHIBITORA - FENILBORONIČNE I KLAVULANSKE KISELINE**

Od ukupno 169 testiranih sojeva, u 104 soja (59,7%) dodatak fenilboronične kiseline imao je značajan učinak na smanjenje MIK-ova ceftazidima i imipenema pa su medijani MIK-ova za ove antibiotike u prisustvu inhibitora interpretirani kao osjetljivi, kako prikazuje Tablica 18.

S druge strane, dodatak klavulanske kiseline nije imao značajan učinak na minimalnu inhibicijsku koncentraciju ceftazidima. Medijan MIK-ova bio je dvostruko veći kada je ceftazidimu bila dodana klavulanska kiselina.

Od ukupno 84 izolata koji su imali rezistotip I, njih 71 (84,5%) pokazivalo je značajno smanjenje MIK-a ceftazidima pri dodatku boronične kiseline, u odnosu na 13 sojeva (15,5%) u kojih nismo dokazali značajan učinak fenilboronične kiseline na MIK ceftazidima. Od 85 izolata s ostalim rezistotipovima (II-IX) njih 52, odnosno 61,2% nije pokazalo značajan učinak boronične kiseline na MIK ceftazidima. Ova razlika u odnosu na prethodnu skupinu bila je statistički značajna ( $\chi^2$  24,5;  $p < 0,001$ ).

### **6.9 FENOTIPSKA DETEKCIJA POJAČANOG RADA EFLUKSNIH CRPKI**

Od ukupno 169 testiranih sojeva, njih 143 (84,6%) imalo je odnos minimalnih inhibicijskih koncentracija za karbenicilin, cefotaksim, ceftazidim i piperacilin koji je govorio u prilog efuksa kao mogućeg mehanizma rezistencije, kao što prikazuje Tablica 19. Od tih 143 izolata, njih 91 (63,6%) pokazivalo je i značajan učinak boronične kiseline na minimalnu inhibicijsku koncentraciju ceftazidima. U 26 izolata odnos minimalnih inhibicijskih koncentracija nije

govorio u prilog efluksa kao mogućeg mehanizma rezistencije. Među tim izolatima njih 7 pokazivalo je značajno smanjenje MIK-a ceftazidima u prisustvu fenilboronične kiseline.

**Tablica 18. Učinak inhibitora na vrijednosti MIK-ova ceftazidima i imipenema.**

<b>Antibiotik (i inhibitor)</b>	<b>Raspon MIK-ova</b>	<b>Medijan MIK-ova</b>
CEFTAZIDIM	2->128	16
CEFTAZIDIM S BORONIČNOM KISELINOM	0,5->128	4
CEFTAZIDIM S KLAVULANSKOM KISELINOM	4-128	32
IMIPENEM	16->128	16
IMIPENEM S BORONIČNOM KISELINOM	4->128	4

S obzirom da efluksne pumpe pseudomonasa često imaju fluorirane kinolone i aminoglikozide među supstratima, odredili smo koliko je izolata bilo pored opisanih učinaka fenilboronične kiseline i efluksa rezistentno na fluorokinolone i aminoglikozide.

Većina izolata u kojih su odnosi minimalnih inhibicijskih koncentracija za karbencilin, cefotaksim, ceftazidim i piperacilin govorili u prilog efluksa bili su ujedno otporni i na ciprofloksacin (ukupno 110 od 143 izolata, odnosno 76,9%), kao što prikazuje Tablica 20.

**Tablica 19. Odnos broja izolata s fenotipski detektiranim pojačanim radom efluksnih crpki i onih sa značajnim učinkom fenilboronične kiseline.**

<b>Učinak</b>	<b>Broj izolata (% od ukupnog broja)</b>
Učinak fenilboronične kiseline ukupno	98 (57,9)
Učinak efluksa ukupno	143 (84,6)
Učinak efluksa i fenilboronične kiseline	91 (53,9)
Samo učinak efluksa	52 (30,8)
Samo učinak fenilboronične kiseline	7 (4,1)
Bez učinka efluksa i bez učinka fenilboronične kiseline	19 (11,2)

Većina izolata otpornih na ciprofloksacin bila je otporna i na aminoglikozide tj. 108 od ukupno 110 izolata otpornih na ciprofloksacin, kako prikazuje tablica 20.

**Tablica 20. Učestalost izolata otpornih na fluorokinolone i aminoglikozide među izolatima s fenotipski detektiranim pojačanim radom efluksnih crpki.**

<b>Grupa izolata</b>	<b>Broj (%) izolata rezistentnih na ciprofloksacin</b>	<b>Broj (%) izolata rezistentnih na ciprofloksacin i aminoglikozide</b>	<b>Broj (%) izolata osjetljivih na ciprofloksacin i aminoglikozide</b>	<b>Ostali</b>	<b>Ukupno</b>
Samo učinak efluksa	35 (67,3)	35 (67,3)	5 (9,6)	12	52

Efluks i inhibicija fenilboroničnom kiselinom	75 (82,4)	73 (80,2)	3 (3,3)	13	91
Ukupno	110 (76,9)	108 (75,5)	8 (5,6)	25 (17,5)	143 (100)

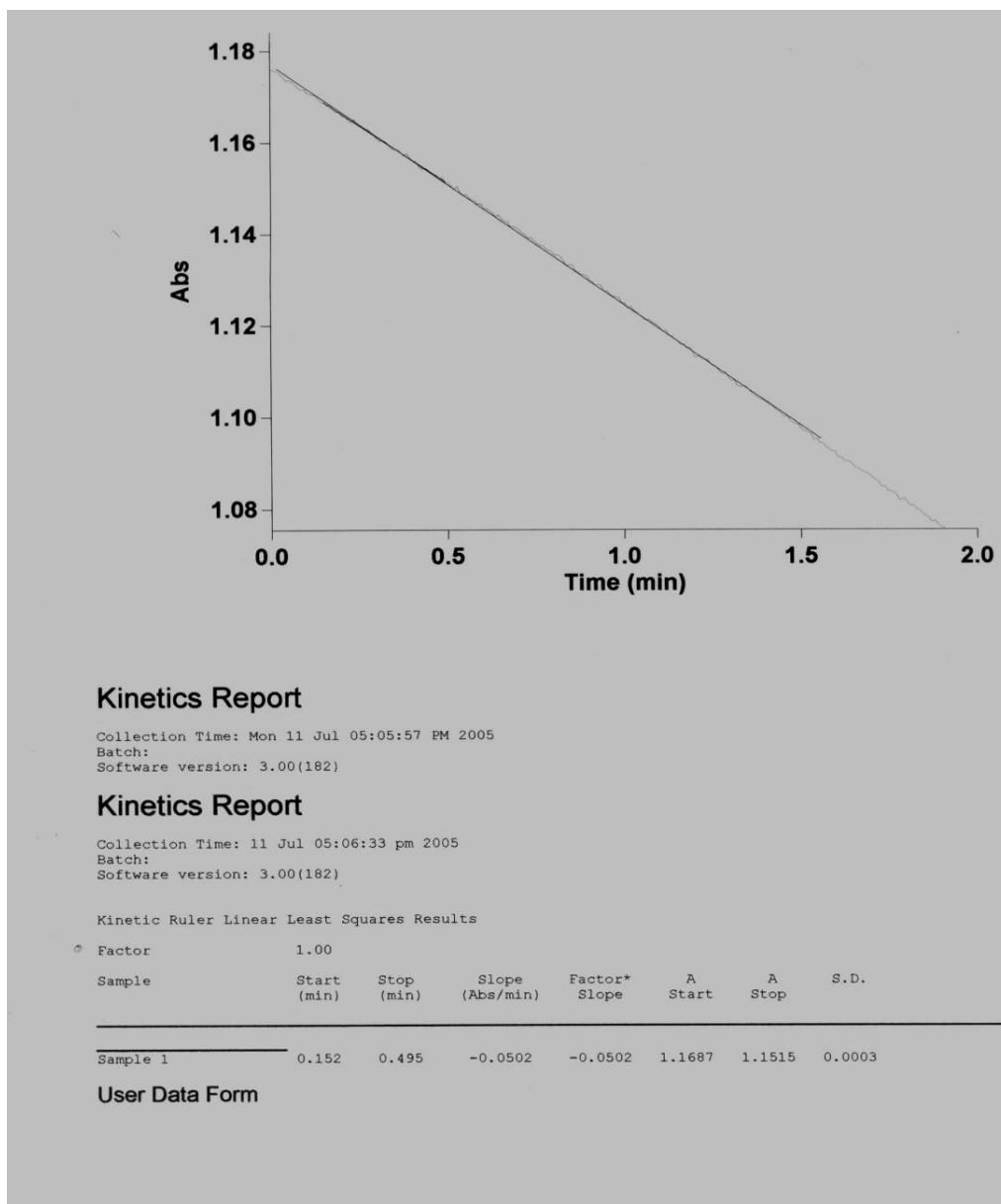
---

## 6.10 ENZIMATSKI ESEJI IZ STANIČNIH EKSTRAKATA

### 6.10.1 ISPITIVANJE AKTIVNOSTI MBL (HIDROLIZA IMIPENEMA)

Svim izolatima koji su u EPI testu pokazivali smanjenje MIK-a imipenema za  $\geq 4X$  urađeni su ekstrakti staničnih kultura i ispitana spektrofotometrijski moguća hidrolitička aktivnost prema imipenemu. Samo su sojevi 3, 4, 5, 6, 43 i 178 pokazali značajnu hidrolitičku aktivnost u prisustvu supstrata (imipenema), kao što prikazuje programski zapis - slika 15. Ista aktivnost bila je više od 90% inhibirana nakon inkubacije izolata u prisustvu 5 mM EDTA, odnosno ponovno uspostavljena dodatkom cinkovih iona. Negativna kontrola imala je specifičnu hidrolitičku aktivnost  $< 10$  nmol/min/g proteina.

Enzimatska aktivnost staničnih ekstrakata u prisustvu imipenema izračunata je na temelju brzine smanjenja apsorbancije, a kretala se od 120 do 160 nmol/min/mg proteina, kao što prikazuje Tablica 21.



**Slika 15. Programski zapis spektrofotometrijski mjerene hidrolize imipenema u MBL pozitivnog soja (br. 43).**

*Hidroliza se vidi kao pad vrijednosti absorbancije, odnosno smanjenje koncentracije supstrata.*

*Tablica 21. Jačina hidrolitičke aktivnosti staničnih ekstrakata u prisustvu imipenemskog supstrata.*

<b>Izolat</b>	<b>Enzimatska aktivnost u prisustvu imipenema</b>
3	160 nmol/min/g proteina
4	140 nmol/min/g proteina
5	160 nmol/min/g proteina
6	120 nmol/min/g proteina
43	160 nmol/min/g proteina
178	140 nmol/min/g proteina
Indeks soj 1 (poz. kontrola)	>170 nmol/min/g proteina

## **6.11 DETEKCIJA OprD PROTEINA VANJSKE MEMBRANE**

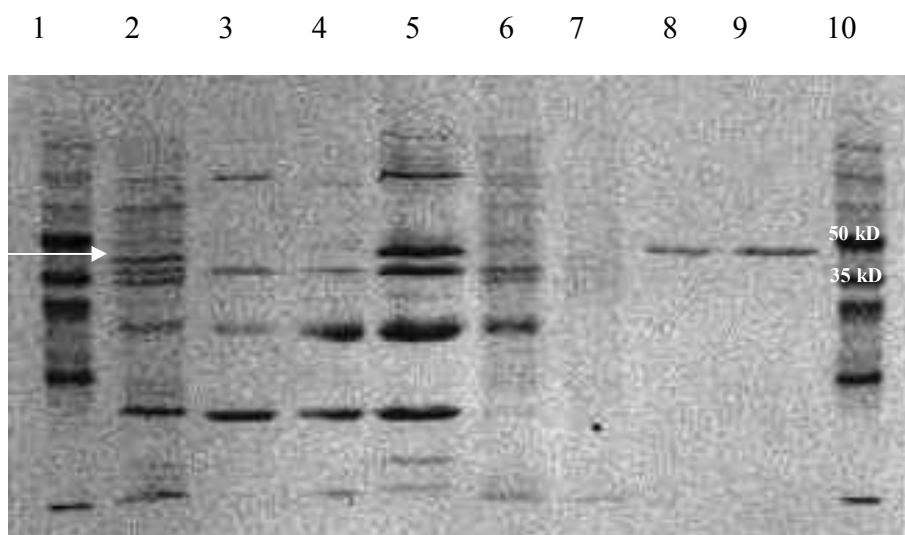
SDS-PAGE elektroforeza ekstrakata staničnih membrana pokazala je u samo 22 izolata, odnosno 13,1% od ukupnog broja izolata postojanje OprD proteina vanjske membrane (Slika 16). U većine izolata tj. u preostalim 147 izolata (86,9%) nije se uspjelo dokazati prisustvo oprD proteina na vanjskoj membrani, bez obzira o kojem se pretpostavljenom mehanizmu rezistencije radilo, kao što prikazuje Tablica 22. Među izolatima koji su pokazivali značajan učinak fenilboronične kiseline i odnose MIK-ova koji su govorili u prilog pojačane ekspresije efluksnih crpki u nešto manje od petine izolata dokazano je prisustvo OprD proteina. Ni u jednog izolata u grupi onih koji su pokazivali samo učinak fenilboronične kiseline, a bez dodatnog efluksnog mehanizma rezistencije nije dokazano prisustvo oprD. Također je u većine



izolata u kojih se nije mogao dokazati učinak fenilboronične kiseline već samo efluksnog mehanizma, izostao protein D vanjske membrane u vertikalnoj elektroforezi proteina staničnih membrana, odnosno dokazan je u samo četiri (7,7%) od ukupno 52 takva izolata (Tablica 23). Među izolatima u kojima nismo dokazali ni učinak boronične kiseline na ekspresiju cefalosporinaze, ni vjerojatni efluksni mehanizam, nismo dokazali ni prisustvo proteina oprD na vanjskoj membrani.

**Tablica 22. Detekcija oprD proteina SDS-PAGE elektroforezom ekstrakata staničnih membrana, a s obzirom na mogući mehanizam rezistencije na  $\beta$ -laktame.**

<b>Mehanizam rezistencije</b>	<b>Broj izolata</b>	<b>Broj izolata s oprD proteinom (%)</b>	<b>Broj izolata bez OprD proteina (%)</b>
Efluks i učinak fenilboronične kiseline	91	18 (17,6)	73 (80,2)
Samo učinak fenilboronične kiseline	7	0 (0)	7 (100,0)
Samo efluks	52	4 (7,7)	48 (92,3)
Bez efluksa, bez učinka fenilboronične kiseline	19	0 (0)	19 (100,0)
<b>Ukupno</b>	<b>169</b>	<b>22 (13,1)</b>	<b>147 (86,9)</b>



**Slika 16. SDS-PAGE elektroforeza proteina vanjske membrane *P. aeruginosa*.**

Linije 1 i 10 marker mol. težine proteina. Linija 2 poz. kontrola (PAOI). Linija 7 i 8 izolirani protein molekulske težine 47 kD (alkalna fosfataza), korišten radi lakše interpretacije. Izolat u liniji 4 i 5 imaju oprD protein, ostali izolati nemaju. Izolat u liniji 7 nema dovoljnu koncentraciju bjelančevina. Strelica lijevo pokazuje položaj oprD (46 kD).

U skupini izolata u kojih je dokazan učinak fenilboronične kiseline, efluksa i koji nisu imali protein vanjske membrane D1 najveći broj sojeva imao je rezistotip I - 48 od 73 izolata (65,7%), dok je od preostalih 25 izolata njih 23 imalo rezistotip II, III i IV, dakle također multirezistentni fenotip (Tablica 23). Samo su dva izolata u ovoj skupini imala rezistotip VIII.

U skupini izolata u kojih je dokazana pojačana aktivnost AmpC i efluks, ali i prisustvo proteina D1 (18 izolata) svi su izolati imali rezistotip I, odnosno bili su rezistentni na predstavnike svih testiranih skupina antipseudomonasnih antibiotika.

Druga skupina po učestalosti pojavljivanja u ukupnom uzorku bila je skupina izolata u kojih se nije dokazao značajan učinak fenilboronične kiseline na smanjenje MIK-a ceftazidima, odnosno hiperekspresija AmpC cefalosporinaze, ali se fenotipski utvrdilo postojanje pojačanog rada efluksnih crpki i gubitak porina D1. U ovoj skupini izolati su bili raspoređeni u gotovo svim rezistotipovima s nešto većom učestalošću rezistotipa I (15 od 48; 31,2%), rezistotipa IX (izolirana rezistencija na karbapeneme - 12 od 48; 25%) i rezistotipa V (osjetljivost na cefalosporine - 8 od 48; 16,7%).

Treća skupina po broju izolata bila je ona u kojoj nismo dokazali ni hiperekspresiju AmpC ni pojačan učinak efluksnih crpki već samo nepostojanje proteina D1 na vanjskoj membrani. U ovoj skupini nešto više od polovice izolata pripadalo je rezistotipu V, odnosno bilo je osjetljivo samo na cefalosporine (10 od 19 izolata, odnosno 52,6%).

Može se dakle zaključiti da je rezistotip I odnosno rezistenciju na predstavnike antipseudomonasnih antibiotika iz skupine ureidopenicilina, cefalosporina, karbapenema, aminoglikozida i fluorokinola bio posljedica u najvećem broju slučajeva hiperekspresije AmpC, efluksa i gubitka porina vanjske membrane D1.

Rezistotip II, odnosno rezistencija na sve antipseudomonasne antibiotike s izuzetkom aminoglikozida, rezistotip III, s izuzetkom fluorokinolona i rezistotip IV, s izuzetkom ureidopenicilina, zabilježena je većinom u izolata s gubitkom porina i hiperekspresijom AmpC i efluksnih crpki.

Rezistotip V, odnosno izoliranu osjetljivost na cefalosporine imali su izolati sa ili bez pojačanog rada efluksnih crpki, ali uz gubitak porina D1.

Rezistotip VI imala su dva izolata osjetljiva na aminoglikozide i fluorokinolone u kojih se nije dokazao porin D1, ali ni utjecaj efluksa, odnosno hiperekspresija AmpC.

**Tablica 23. Učestalost pojedinih rezistotipova, a s obzirom na vjerojatni mehanizam rezistencije na karbapeneme.**

<b>Rezistotip/ Mehanizam rezistencije</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>	<b>VII</b>	<b>VIII</b>	<b>IX</b>	<b>Ukupno</b>
Učinak AmpC, efluksa i gubitka porina D1	48	6	9	8				2		73
Učinak AmpC i efluksa uz porin D1	18									18
Učinak AmpC i gubitka porina D1	1	1		1	4					7
Učinak efluksa i gubitka porina D1	15	3		3	8		1	6	12	48
Učinak efluksa uz porin D1	2						1	1		4
Samo gubitak porina D1		1			10	2		2	4	19
<b>Ukupno</b>	<b>84</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>169</b>

Rezistotip VII, osjetljivost na cefalosporine i ureidopeniciline zabilježen je u dva izolata bez hiperekspresije AmpC, ali s gubitkom D1 proteina i pojačnim efluksom.

Rezistotip VIII - rezistencija samo na karbapeneme i fluorokinolone zabilježena je u 11 izolata u kojih je većina imala pojačan rad efluksnih crpki i gubitak porina D1.

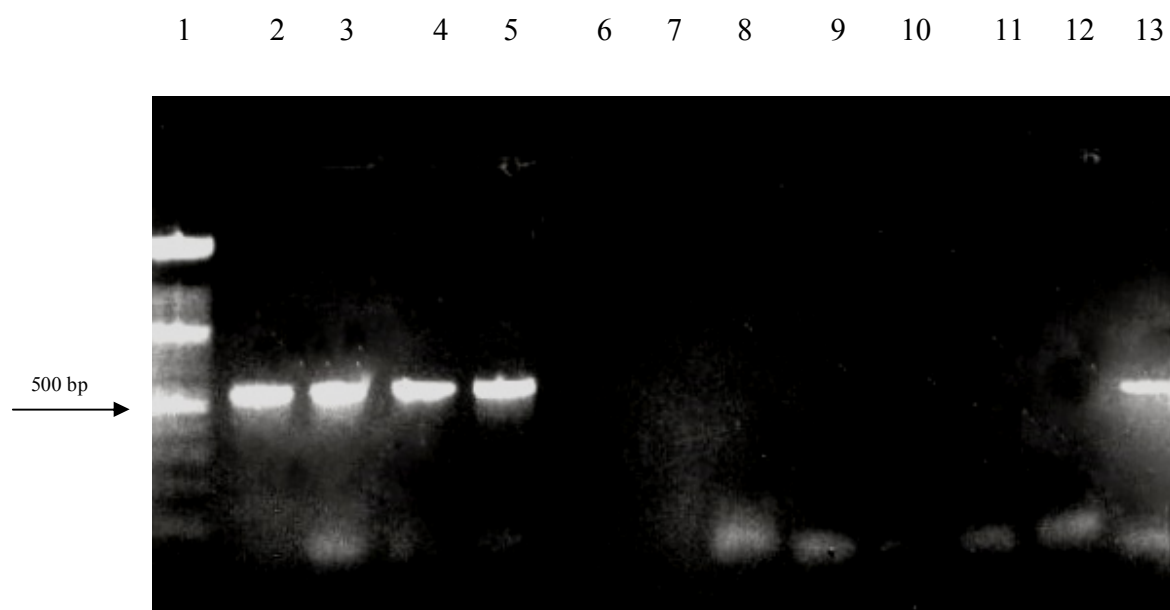
Naposljetku, rezistotip IX, odnosno izoliranu rezistenciju na karbapeneme imalo je 16 izolata od kojih je većina (12 od 16; 75%) imala gubitak proteina vanjske membrane i pojačan rad efluksnih crpki.

## 6.12 MOLEKULARNE METODE

### 6.12.1 AMPLIFIKACIJA GENA ZA MBL (VIM, IMP)

Lančana reakcija polimeraze s početnicama koje amplificiraju gene *bla<sub>VIM</sub>* i *bla<sub>IMP</sub>* urađena je za sve izolate. Dokazano je prisustvo amplicona VIM-gena u izolatima 3, 4, 5, 6, 43 i 178, kao što prikazuje slika 17.

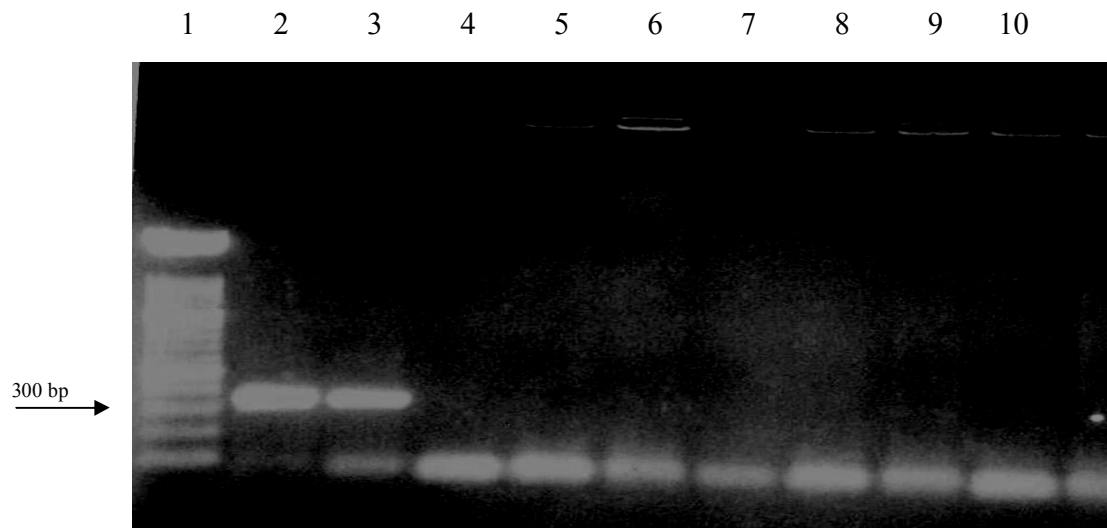
Amplifikacija IMP gena nije dala pozitivan rezultat ni za jedan testirani soj. Amplificirala se samo IMP pozitivna kontrola, kao što prikazuje slika 18.



**Slika 17. Amplifikacija gena *bla<sub>VIM</sub>*.**

Fotografija agaroznog gela s prikazom amplicona gena *bla<sub>VIM</sub>* za izolate 3-6.

Linija 1 MWM 100 bp. Linije 2-5: izolati 3, 4, 5 i 6. Linija 13 poz. kontrola (VA-182).



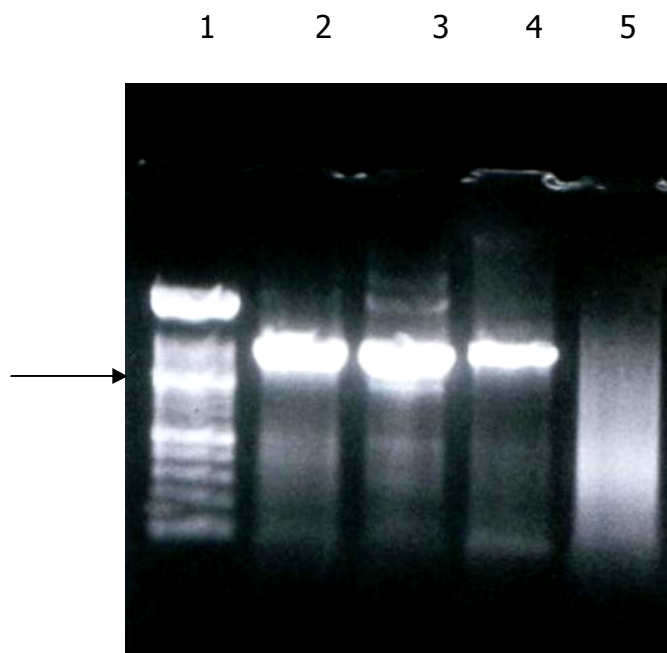
**Slika 18. Amplifikacija gena *bla<sub>IMP</sub>*.**

Linija 1 DNK marker 100 bp, linije 2 i 3 pozitivna kontrola (361 bp). Linije 4-10, izolati bez amplifikacije željenog gena.

### 6.12.2 AMPLIFIKACIJA GENA ZA PROTEIN VANJSKE MEMBRANE OPRD

Lančana reakcija polimeraze s početnicama koje amplificiraju gen *OprD* urađena je za sve izolate. U nešto više od polovine izolata, odnosno u 93 od ukupno 169 (55%) izolata amplificirao se dio gena željene veličine, tj. 1416 bp koji kodira protein vanjske membrane D1, odnosno OprD (Slika 19). Izolati kojima je u SDS-PAGE elektroforezi dokazano prisustvo proteina vanjske membrane OprD imali su i ampikon željene veličine za odgovarajući gen. U skupini od preostalih 71 izolata kojima se amplificirao *OprD* gen, nismo uspjeli dokazati

prisustvo odgovarajućeg membranskog proteina. U preostalih 76 izolata nije se mogao amplificirati *OprD* gen ni dokazati membranski protein OprD.



**Slika 19. Amplifikacija gena *OprD*.**

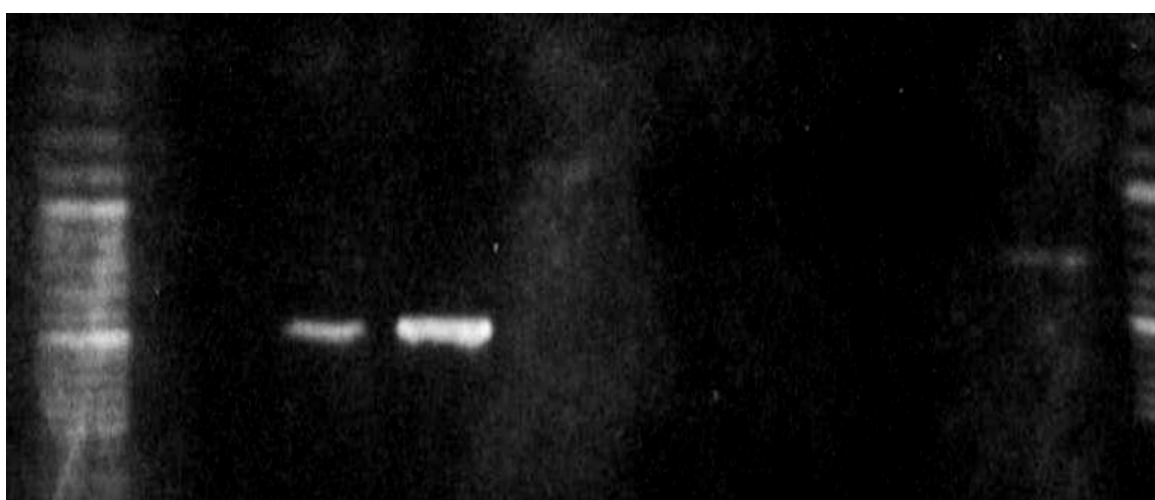
Linija 1 marker molekulske težine 100 bp, linija 2 pozitivna kontrola (*PAOI*). Linija 3 izolat 3, linija 4 izolat 4, linija 5 negativna kontrola. Vidi se ampikon veličine oko 1400 bp. Strelica pokazuje položaj za molekulsku veličinu DNK od 1000 bp.

### **6.12.3 AMPLIFIKACIJA GENA ZA $\beta$ -LAKTAMAZU PROŠIRENOG SPEKTRA PER-1**

Iako u testu dvostrukog diska za detekciju  $\beta$ -laktamaza inhibiranih klavulanskom kiselinom ni jedan izolat nije pokazao moguću inhibiciju  $\beta$ -laktamske aktivnosti klavulanatom, kao ni u

mikrodilucijskoj metodi, svim izolatima kojima je MIK na ceftazidim i/ili cefepim bio  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  urađena je PCR reakcija s početnicama koje amplificiraju *bla<sub>PER</sub>* gen. Samo je pozitivna kontrola dala amplikon željene veličine tj. oko 900 parova baza, kao što se vidi na Slici 20.

1      2      3      4      5      6      7      8      9      10



**Slika 20. Amplifikacija gena *bla<sub>PER-1</sub>*.**

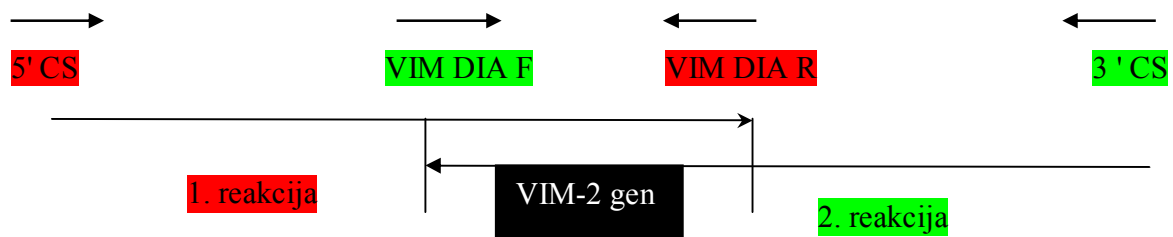
Linije 1 i 10 marker molekulske težine 100 bp. Linija 2 negativna kontrola, linija 3 i 4 pozitivna kontrola (soj *Pa* 463/98). Linije 5-9 izolati *P. aeruginosa* u kojih se nije amplificirao *bla<sub>PER</sub>* gen.

#### **6.12.4 AMPLIFIKACIJA INTEGRONA ZA VIM-POZITIVNE IZOLATE**

Koristeći početnice za amplifikaciju konzerviranog dijela integrona i početnice za amplifikaciju *bla<sub>VIM</sub>* gena, urađene su za svaki VIM pozitivan izolat po dvije PCR reakcije i to jednom s kombinacijom početnica koje amplificiraju 5' dio konzerviranog segmenta integrona i reverznu



početnicu za amplifikaciju VIM gena (5' CS i VIM DIA R) te drugi puta s kombinacijom forward početnice koja amplificira VIM gen i reverzne početnice za 3' konzervirani segment integrona (VIM DIA F i 3' CS). Slika 21 prikazuje shemu korištenih početnica s obzirom na položaj VIM gena u integronu. Ovaj način amplifikacije integrona urađen je s obzirom na nepredvidljivu veličinu integrona koji bi se mogao amplificirati, a za koji smo očekivali da je veći od 2000 parova baza.



*Slika 21. Shematski prikaz korištenih početnica u odnosu na položaj VIM gena u integronu u PCR reakcijama za amplifikaciju integrona.*

#### **6.12.4.1 PRVA REAKCIJA AMPLIFIKACIJE INTEGRONA –**

##### **AMPLIFIKACIJA 5' KRAJA S KONZERVIRANIM SEGMENTOM**

Za izolate 3, 4, 5, 6, 43 i 178 koji su u PCR reakciji amplifikacije  $bla_{VIM}$  gena dali ampikon, u PCR reakcijama amplifikacije dijelova integrona dobili smo ampikone i to jednake veličine za sve izolate. Naime u prvoj PCR reakciji kojom smo željeli amplificirati dio integrona od 5'

dijela konzerviranog segmenta do VIM gena, uključujući i cijeli VIM gen, dobili smo amplikon veličine oko 1300 parova baza, kao što prikazuje Slika 22.

U PCR reakciji kojom smo amplificirali VIM gen dobili smo amplikon od oko 500 parova baza, koji je predstavljao dio VIM gena. U ovoj reakciji amplifikacije integrona uspjeli smo amplificirati cijeli konzervirani segment na 5' kraju integrona i s obzirom na veličinu dobivenog amplikona, pretpostavili smo da se amplificirala cijela prva genska kazeta, koju sačinjava VIM gen, a što ćemo naknadno pokušati potvrditi sekvenciranjem.

#### **6.12.4.2 DRUGA REAKCIJA AMPLIFIKACIJE INTEGRONA - AMPLIFIKACIJA 3' KRAJA S KONZERVIRANIM SEGMENTOM**

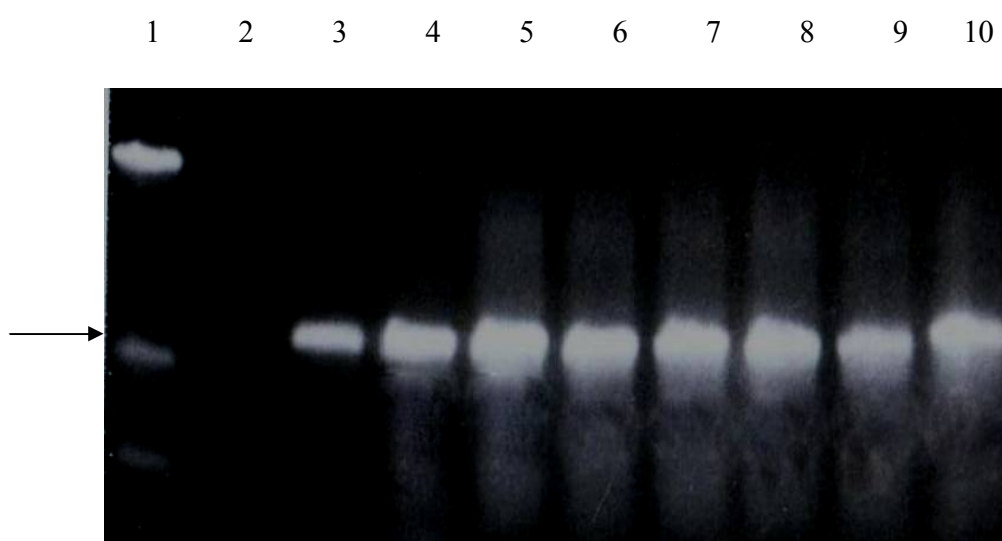
U drugoj reakciji amplifikacije integrona, koristili smo početnicu koja amplificira integron od 3' konzerviranog segmenta i početnicu koja amplificira VIM-gen, kao što prikazuje Slika 21.

U ovoj reakciji očekivali smo da će se ponovo amplificirati cijeli gen za VIM metalo- $\beta$ -laktamazu, odnosno, genska kazeta koja sadržava ovaj gen te sve genske kazete koje se nalaze u integronu "nizvodno" odnosno prema 3' konzerviranom kraju.

Broj genskih kazeta koje se nalaze unutar pojedinog integrona ne može se predvidjeti, a budući da su integroni koji su do sada publicirani, a koji su sadržavali gene za metalo- $\beta$ -laktamaze bili varijabilne veličine, od oko 2000 pa do preko 4000 parova baza, veličina amplikona ovisila je o broju genskih kazeta koje će se amplificirati do 3' kraja integrona.

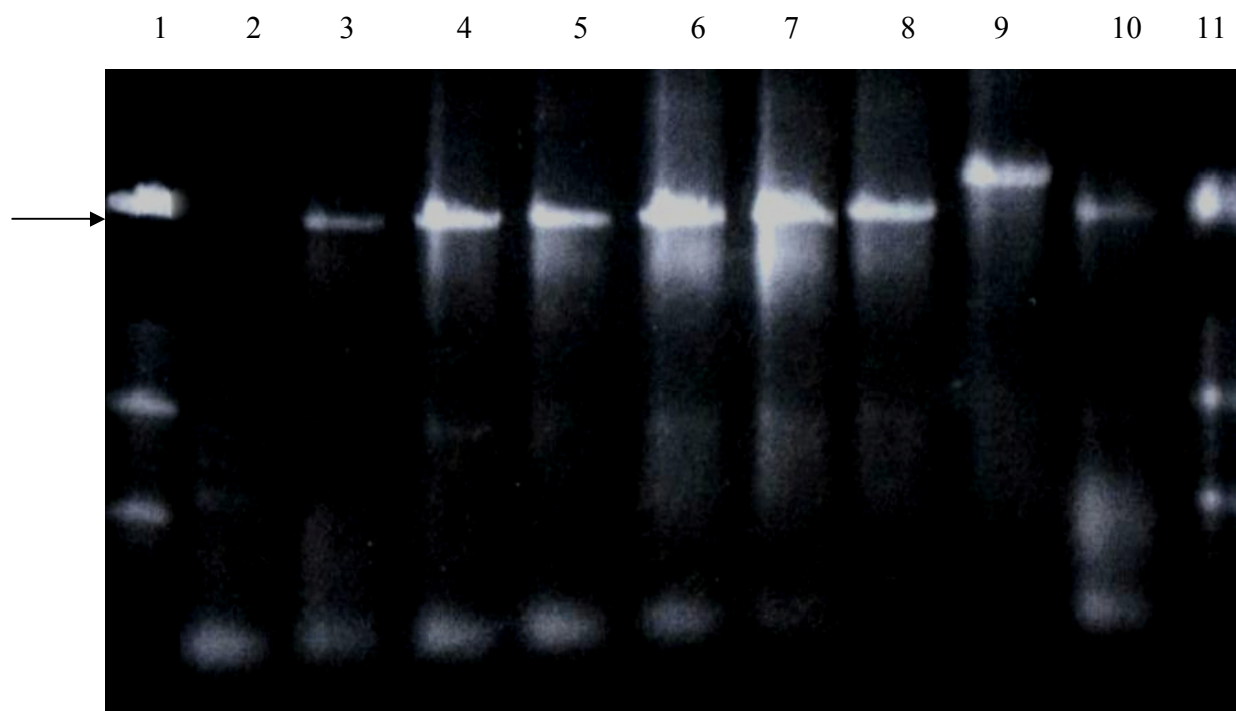
U ovoj amplifikacijskoj reakciji za izolate 3-6, 43 i 178 dobijen je amplikon veličine oko 2000 parova baza, kao što prikazuje Slika 23. Za pozitivnu kontrolu VA 182/00 amplikon je bio

nešto veći (očekivana veličina 2500 bp), a za indeks soj-2, drugu korištenu pozitivnu kontrolu amplicon je u ovoj reakciji bio iste veličine kao i novootkrivenim VIM-pozitivnim izolatima.



**Slika 22. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije integrona VIM pozitivnih sojeva s početnicama 1. reakcije (5'CS, VIM-DIA-R).**

Linija 1 MWM, linija 2 neg. kontrola, linija 3 pozitivna kontrola (izolat VA-182), linija 4 index soj 1, linija 5 izolat 3, linija 6 soj 4, linija 7 izolat 5, linija 8 izolat 6, linija 9 izolat 43, linija 10 izolat 178. Strelica pokazuje 1000 bp.



***Slika 23. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije integrona VIM pozitivnih sojeva s početnicama 2. reakcije (3'CS, VIM-DIA-F).***

*Linija 1 i 11 MWM, linija 2 neg. kontrola, linija 3 izolat 3, linija 4 izolat 4, linija 5 izolat 5, linija 6 izolat 6, linija 7 izolat 43, linija 8 izolat 178, linija 9 pozitivna kontrola (VA 182/00), linija 10 indeks soj 2. Strelica pokazuje 2000 bp.*

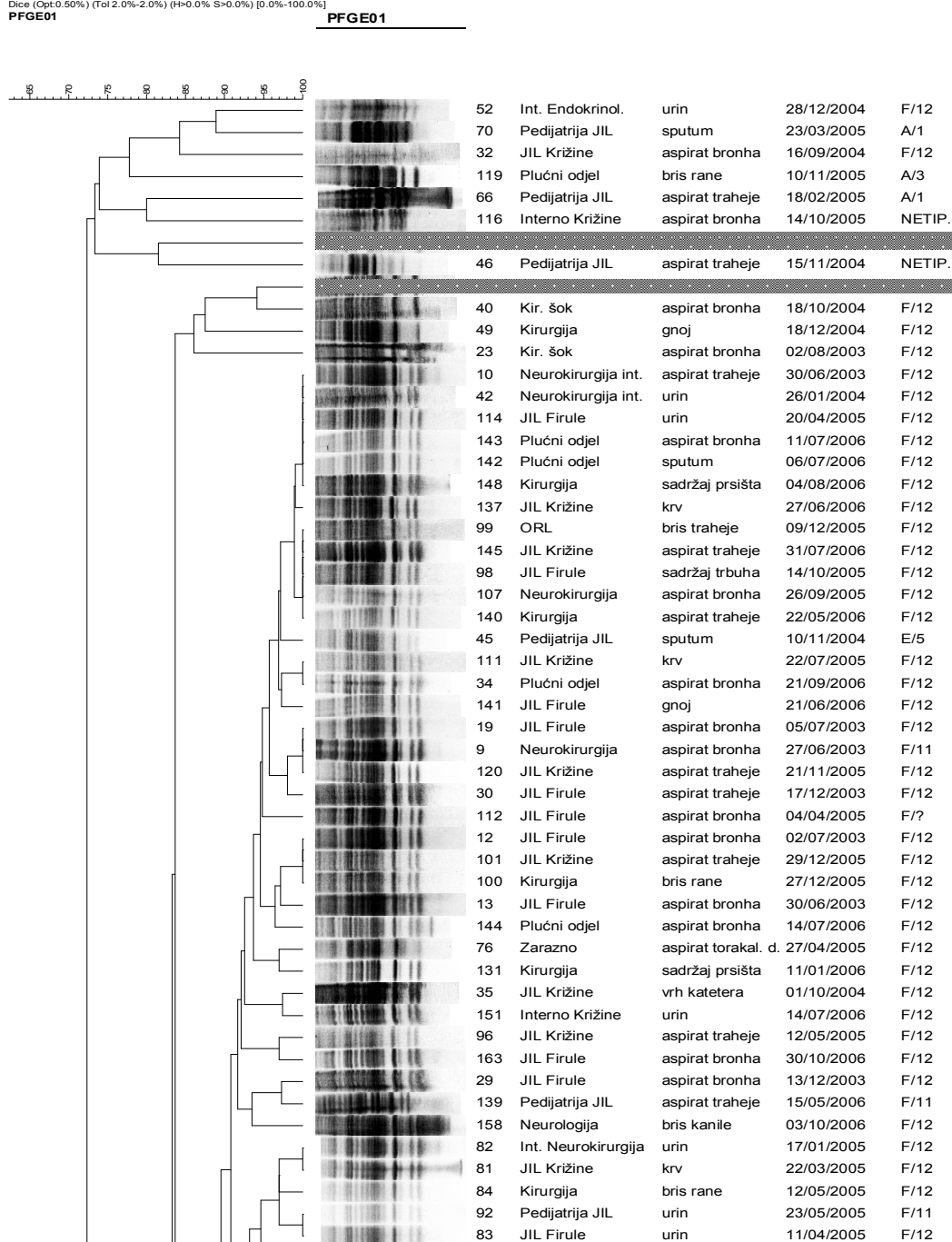
## **6.13 GENOTIPIZACIJA IZOLATA**

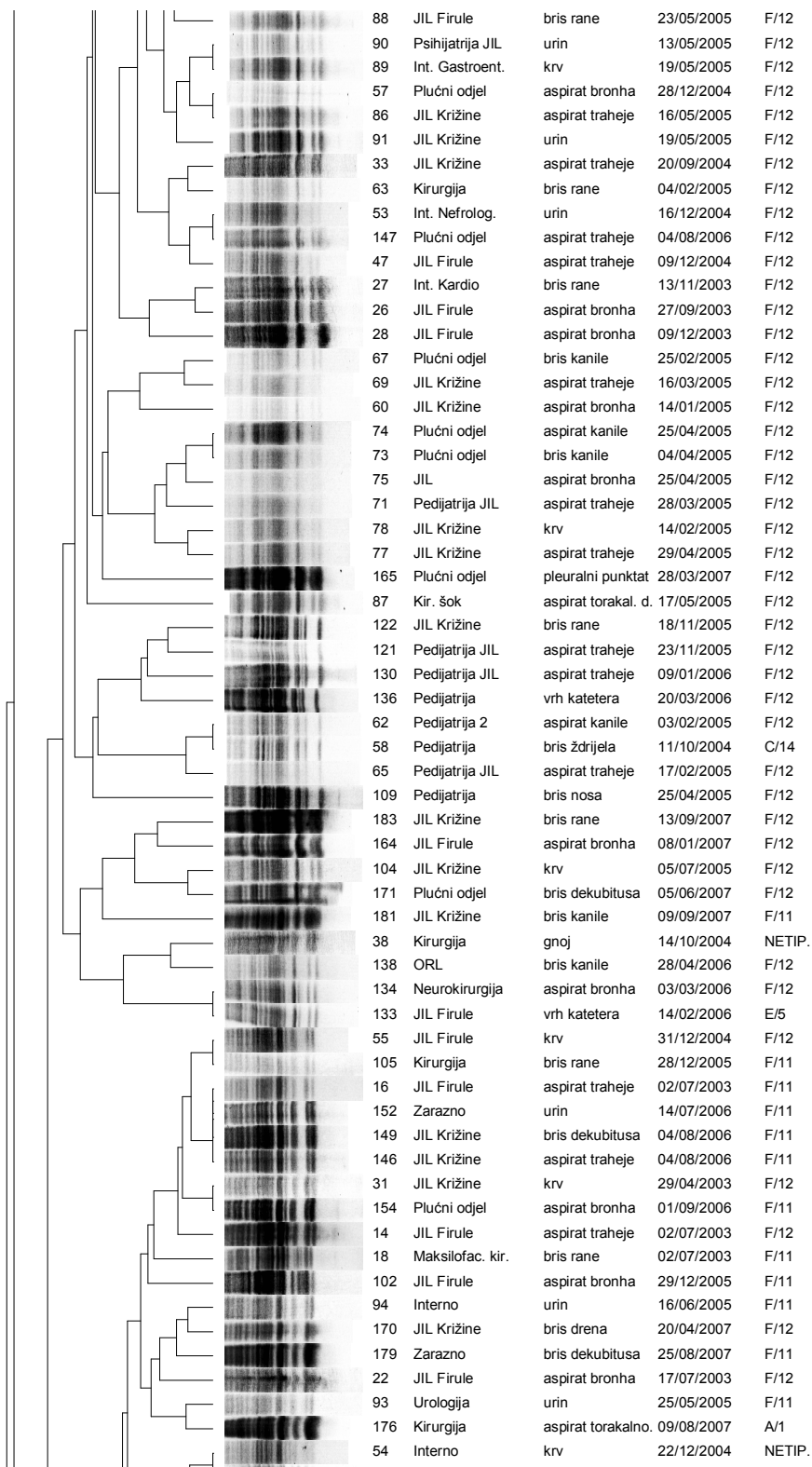
### **6.13.1 GENOTIPIZACIJA ELEKTROFOREZOM U PULZIRAJUĆEM POLJU**

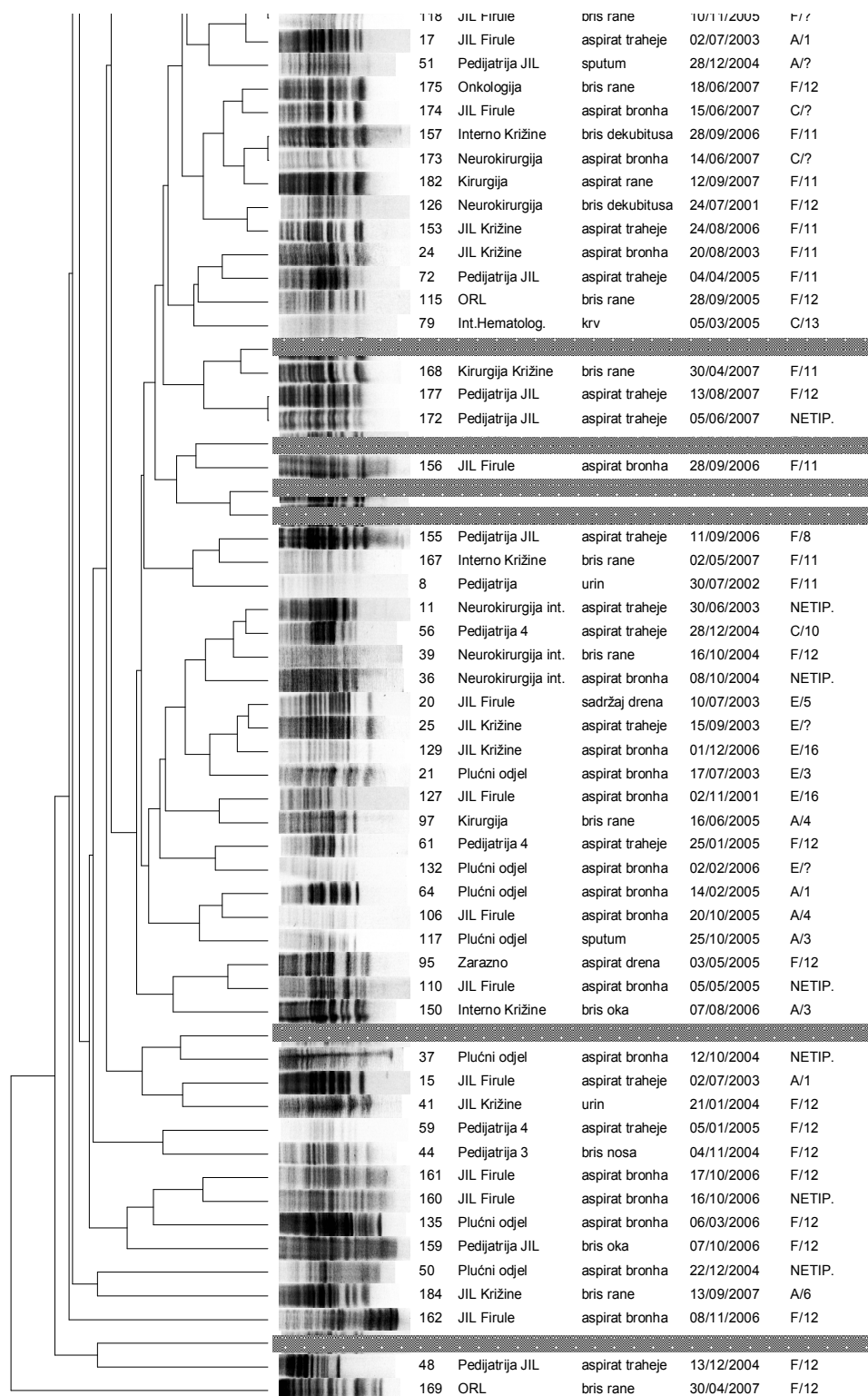
Računalnom obradom skeniranih fotografija agaroznih gelova nakon elektroforeze u pulzirajućem polju pocijepane genomske DNK svih 169 izolata *Pseudomonas aeruginosa* s uključenim indeks sojevima 1 i 2 (sveukupno 171) uz pozicijsku toleranciju 2% dobiven je dendrogram, kao što prikazuje Slika 24. Na slici se uočava, uz Dice-ov koeficijent sličnosti od 80% koji je uzet kao prijelomna vrijednost za srodnost izolata (a odgovarao bi kriteriju "vjerojatno srodni" Tenovera i sur.), da je najveći broj izolata (77; 45%) pripadao klonskom tipu koji je, kao dominantan, nazvan A (s 12 podtipova; podtipovi A1-A12); sljedeći po učestalosti bio je klonski tip B unutar kojeg se nalazio 61 (35,7%) izolat. Unutar ovog klonskog tipa izolati su se raspodjelili u 15 podtipova (B1-B15). Preostalim klonskim tipovima pripadalo je sveukupno 33 (19,3%) izolata raspodijeljenih u 7 podtipova (C-I). Klonski nesrodni svim ostalim izolatima (odnosno čiji je koeficijent sličnosti bio manji od 80% u odnosu na sve ostale izolate) bili su sojevi 50, 184, 162, 3, 48 i 169, kao što prikazuje Tablica 24.

MBL pozitivni sojevi unutar ove komparacije pripadali su većinom klonskom tipu B - tu su izolati rednog broja 4, 5, 6 i 178. Izolat 43 pripadao je klonskom tipu A. Indeks sojevi označeni rednim brojevima 1 i 2 pripadali su klonskom tipu H, odnosno D, dok izolat 3 nije bio klonski srodan ni jednom klonskom tipu.

Dice (Opt:0.50%) (Tol:2.0%-2.0%) (H=0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
 PFGE01







**Slika 24. Dendrogram svih izolata analiziranih u ovom radu.**



Prikazani su dijelovi skeniranih fotografija agaroznih gelova s vrpcama migracije pocijepane DNK, redni brojevi izolata, odjeli iz kojih su izolati potekli, uzorci iz kojih su izolirani pseudomonasi, datumi izolacije i serotipovi. Indeks sojevi označeni su rednim brojem 1 i 2. Zeleno su osjenčeni MBL pozitivni izolati.

**Tablica 24. Genotipizacija izolata PFGE metodom. Izolati su svrstani u klonske tipove i klonske podtipove.**

Klonski tip (broj izolata)	Klonski podtip: izolati
A (77)	<b>A1:</b> 43 <sup>*</sup> ; 40; <b>A2:</b> 49; <b>A3:</b> 23; <b>A4:</b> 10, 42, 114, 143, 142, 148, 137, 99, 145, 98, 107, 140, 45, 111, 34, 141, 19, 9, 120, 30, 112, 12, 101, 100, 13, 144, 76, 131, 35, 151, 96, 163, 29, 139, 158, 82, 81, 84, 92, 83, 88, 90. 89, 57, 86, 91, 33, 63, 53, 147, 47; <b>A5:</b> 27, 26, 28; <b>A6:</b> 67, 69, 60; <b>A7:</b> 74, 73, 75, 71, 78, 77; <b>A8:</b> 165; <b>A9:</b> 87; <b>A10:</b> 122, 121, 130, 136; <b>A11:</b> 62, 58, 65; <b>A12:</b> 109
B (61)	<b>B1:</b> 55, 105, 16, 152, 149, 146, 31, 154, 14, 18, 102, 94, 170, 179, 22, 93, 176; <b>B2:</b> 54, 118, 17, 51; <b>B3:</b> 175, 174, 157, 173, 182, 126, 153; <b>B4:</b> 24, 72, 115, 79; <b>B5:</b> 178, 168, 177, 172; <b>B6:</b> 6, 156, <b>B7:</b> 5, 4; <b>B8:</b> 155, 167, 8; <b>B9:</b> 11, 56, 39, 36; <b>B10:</b> 20, 25, 129, 21; <b>B11:</b> 127, 97; <b>B12:</b> 61, 132; <b>B13:</b> 64, 106, 117; <b>B14:</b> 95, 110; <b>B15:</b> 150
C (9)	<b>C1:</b> 183, 164, 104, 171; <b>C2:</b> 181; <b>C3:</b> 38, 138; <b>C4:</b> 134, 133
D (4)	2, 37, 15, 41
E (4)	161, 160, 135, 159
F (4)	52, 70, 32, 119
G (2)	66, 116
H (2)	1, 46
I (2)	59, 44
Klonski nesrodni (6)	50, 184, 162, 3, 48, 169

\*zelenom bojom označeni su MBL pozitivni izolati (i izolati 1 i 2 - tzv. indeks sojevi)

Iz dendrograma se također može vidjeti da su izolati serotipa O12 koji su bili predominantni u testiranom uzorku (99 od 169 sojeva odnosno 58,6%) pripadali većinski klonskom tipu A (njih 69 od 99, odnosno 69,7%), dok je drugi po učestalosti javljanja, klonski tip B imalo samo 13 izolata (13%) serotipa O12. S druge strane, drugi serotip po učestalosti - serotip O11 kojeg je sveukupno imalo 29 izolata, genetski je pripadao češće klonskom tipu B (24 od 29, odnosno 82,8%) te sporadično klonskom tipu A (3 od 29 izolata 10,3%), kao što prikazuje Tablica 25. Ova razlika u učestalosti pojavljivanja serotipova 11 i 12 s obzirom na PFGE klonski tip A i B bila je statistički značajna ( $\chi^2=54,4$ ;  $p<0,001$ ).

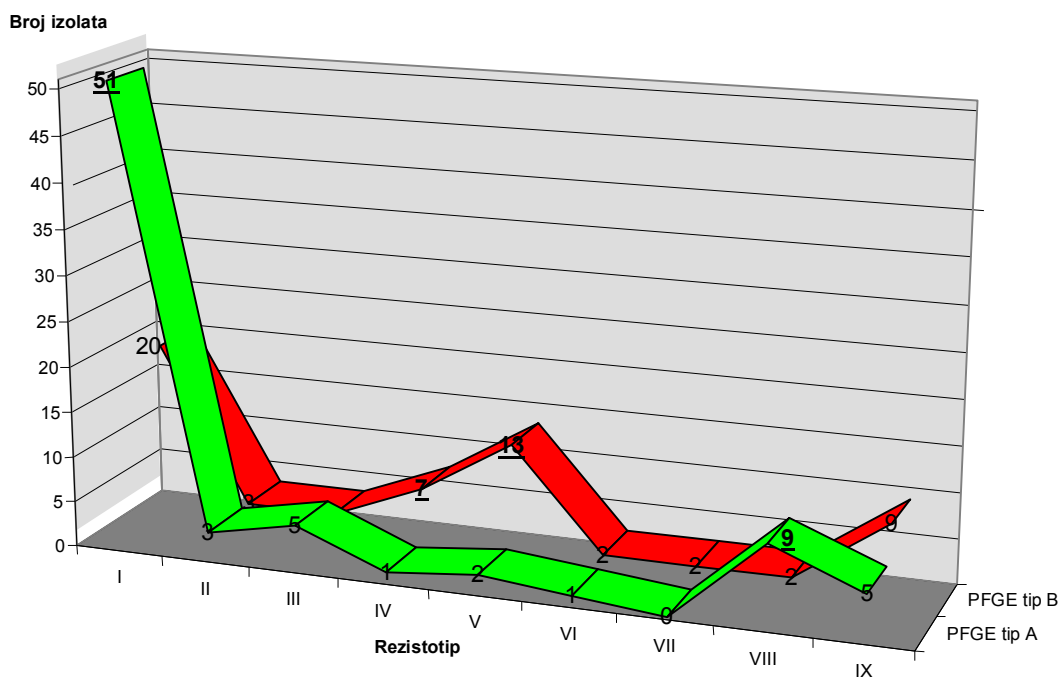
S druge strane, ako se PFGE profili analiziraju u odnosu na rezistotipove, jasno se uočava da rezistotipovi I pripadaju uglavnom PFGE klonskom tipu A (ukupno 51 od 77; 66,2% a 26, odnosno 33,8% imalo je rezistotip II-IX), dok PFGE klonskom tipu B pripadaju izolati koji nisu imali rezistotip I (ukupno 41 od 61; 67,2% imalo je rezistotip II-IX, a 20, odnosno 32,8% imalo je rezistotip I). Ova razlika je bila statistički značajna ( $\chi^2=13,9$ ;  $p<0,01$ ). Među izolatima PFGE klonskog tipa A koji nisu imali rezistotip I, najčešći je bio rezistotip VIII (9 od 26; 34,6%), potom rezistotip IX i rezistotip III s po 5 izolata (19,2%). Samo dva izolata imala su rezistotip V, a jedan rezistotip IV. Među izolatima koji su pripadali klonskom tipu B, a nisu bili rezistotipa I, najveći broj izolata (13 od 61; 21,3%) imao je rezistotip V, potom rezistotip IX (9 od 61; 14,8%) te rezistotip IV (7 od 61; 11,5%). Statistička značajnost razlike na razini  $p<0,05$  Fisherovim-exact testom dobivena je osim za rezistotip I i za učestalost rezistotipa VIII (češći u klonskom tipu A), V (češći u klonskom tipu B) i rezistotipa IV (češći u klonskom tipu B), kao što prikazuje slika 25.

**Tablica 25. Usporedba serotipova i genotipova (po PFGE-XbaI).**

PFGE klonski tip/ Serotip	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Klonski nesrodni	Ukupno
1	1	3		1		1	1				7
3		3				1					4
4		2									2
5	1	1	1								3
6										1	1
8		1									1
10		1									1
11	3	24	1							1	29
12	69	13	6	1	3	2			2	3	99
13		1									1
14	1										1
16		2									2
Seronetipizirani	2	10	1	1	1		1	1		1	18
Sveukupno	77	61	9	3	4	4	2	1	2	6	169

Budući da su izolirani pseudomonasi dijelom pripadali i uzorcima pedijatrijskih bolesnika, analizirani su genotipovi izolata s Klinike za dječje bolesti, uključujući i jedinicu intenzivnoj liječenja djece (Pedijatrijski JIL).

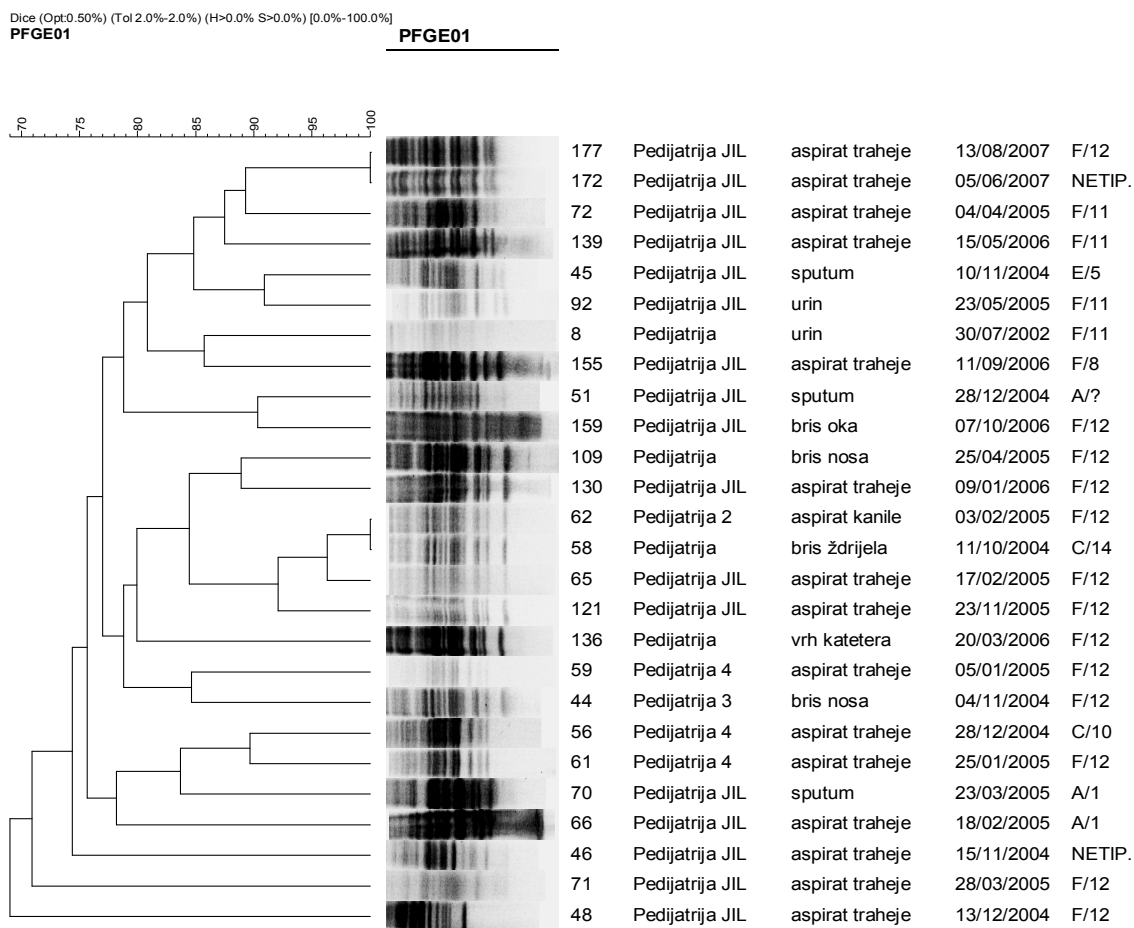
Na slici 26 može se vidjeti da je 26 izolata od 19 pedijatrijskih bolesnika bilo unutar 5 osnovnih klonskih tipova (Ap-Ep).



**Slika 25. Grafički prikaz učestalosti pojedinih rezistotipova u odnosu na klonski tip definiran nakon PFGE, koristeći XbaI restrikcijski enzim.**

S izuzetkom značajne razlike u broju izolata rezistotipa I s obzirom na klonski tip, uočava se razlika u broju izolata rezistotipa IV i V koji čine značajan postotak u klonskom tipu B, te u broju izolata rezistotipa VIII koji čine većinu izolata klonskog tipa A koji ne pripadaju rezistotipu I. Učestalosti za koji postoji statistički značajna razlika između klonskih tipova A i B prikazane su masnim podcrtanim brojevima.

Klonski tip Ap imao je 3 podtipa (Ap1-Ap4) i uključivao je sojeve 177, 172, 72, 139 (Ap1), 45, 92 (Ap2), 8 i 155 (Ap3). Klonskom tipu Bp s tri podtipa pripadali su izolati 109, 130 (Bp1) 62, 58, 65, 121 (Bp2), i 136 (Bp3). Klonski tip Cp imao je dva podtipa, a činili su ga izolati 56, 61 (Cp1) te 70 (Cp2). Klonski tip Dp imali su sojevi 51 i 159, a klonski tip Ep izolati 59 i 44. Genotipski nesrodni svim ostalim sojevima bili su izolati 66, 46, 71 i 48.



**Slika 26. Dendrogram izolata *P. aeruginosa* s Klinike za dječje bolesti.**

Posebno su obrađeni izolati s jedinica intenzivnog liječenja koje se u KBC Split nalaze na dvije lokacije te bolesnici migriraju unutar obje lokacije zbog čega smo očekivali veću genetsku srodnost među izolatima. Dendrogram izolata porijeklom iz jedinica intenzivnog liječenja prikazuje Slika 27.

Ukupno je iz uzoraka s jedinica intenzivnog liječenja obje lokacije izolirano 66 sojeva koji su se mogli svrstati unutar ukupno 5 klonskih tipova s dominantna dva kojima je pripadalo ukupno 56 izolata, odnosno 84,8% (A s 36 odnosno 54,5% izolata i B s 20 odnosno 30,3% izolata).

Predominantnom klonskom tipu Ajil s 8 podtipova (Ajil1-Ajil8) pripadali su izolati 86, 163, 33, 104, 96 (Ajil1), 98, 114, 111, 145, 29, 112, 81, 19, 30, 120, 83, 141, 137, 12, 10, 13 (Ajil2), 26, 35 (Ajil3), 78, 77, 47 (Ajil4), 122 (Ajil5), 20, 25, 129, 88, 32 (Ajil6), 28 (Ajil7) te 60, 91 i 69 (Ajil8).

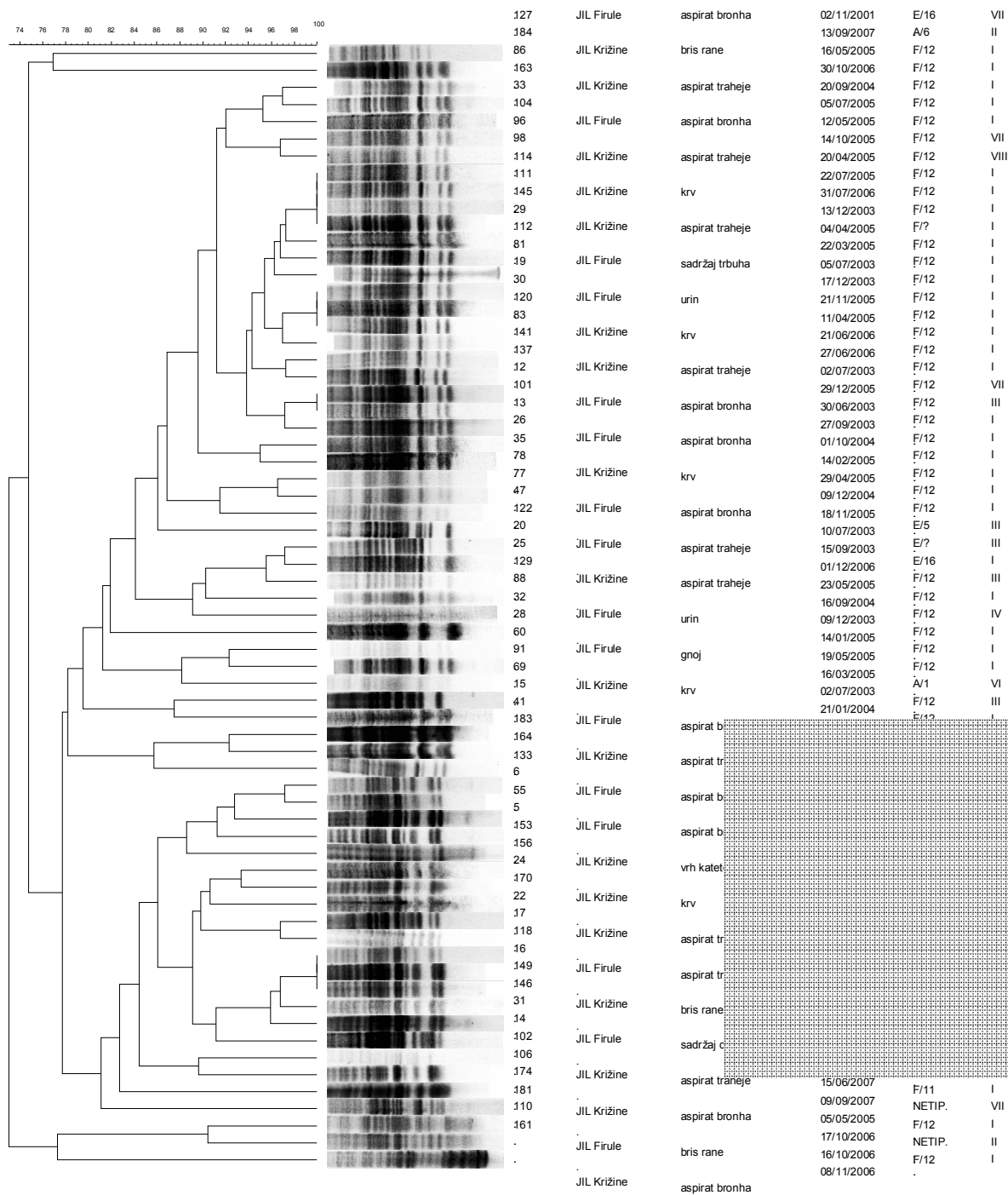
Drugom po zastupljenosti, genskom tipu Bjil sa šest podtipova pripadali su izolati 6, 55, 5, 153, 156 (Bjil1), 24, 170, 22, 17, 118 (Bjil2), 16, 149, 146, 31, 14, 102 (Bjil3), 106, 174 (Bjil4), 181 (Bjil5) te 110 (Bjil6).

Klonskom tipu Cjil pripadali su izolati 183, 164 i 133, tipu Djil 15 i 41, te Ejil 161 i 160. Pojedinačni izolati nesrodni ostalima bili u 162, 127 i 184.

Izolati u kojih je dokazano prisustvo amplikona VIM gena posebno su obrađeni i uspoređeni genotipski s indeks sojevima 1 i 2 odnosno izolatima u kojih je po prvi puta dokazano prisustvo metalo- $\beta$ -laktamaza u sljedećem poglavlju.

Dice (Opt 0.50%) (Td 2.0%-2.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE01

PFGE01



**Slika 27. Dendrogram izolata *P. aeruginosa* iz jedinica intenzivnog liječenja (JIL) na lokacijama Firule i Križine.**

## **6.14 DETEKCIJA SMJEŠTAJA GENA ZA MBL**

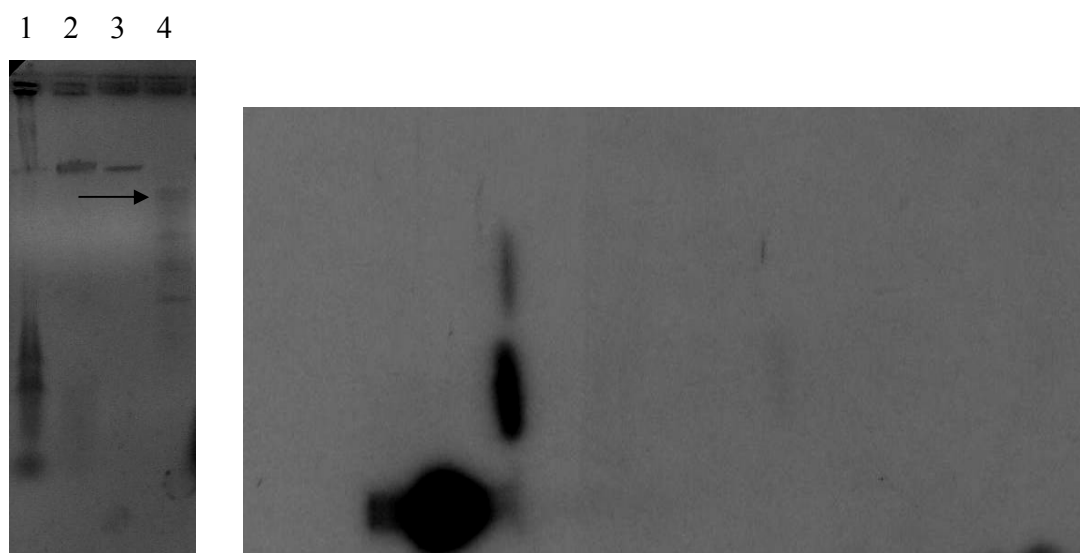
### **6.14.1 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNK**

Ekstrakcija plazmidne DNK s Qiagen Midi kitom uz pozitivnu kontrolu, soj NTCC 50192 *E. coli* poznate molekularne veličine plazmida od 148, 64, 36 i 7 kb nije pokazala prisustvo plazmidne DNK ni u jednom od VIM pozitivnih izolata.

### **6.14.2 SOUTHERN BLOTING**

Ekstrahirana DNK VIM-pozitivnih izolata nanescna je na gel u različitim koncentracijama (određenim spektrofotometrijski): nerazrijeđena, odnosno u koncentraciji 1 mmol/μl, te razrijeđena u koncentracijama 100 pmol/μl i 10 pmol/μl te zatim hibridizirana s VIM PCR-amplikonom koji je bio obilježen Redivue <sup>32</sup>P dCTP po slučajnom principu komercijalnim kitom (Rediprime II Random Prime Labelling System Protocol, Amersham Biosciences Freiburg, Njemačka). Izgled rendgenskog filma za izolat 43 nakon prekonoćne hibridizacije na -70 °C pokazuje slika 28.





**Slika 28. Southern blotting za MBL pozitivne izolate.**

Prikazan je izolat 43. Slika lijevo fotografija agaroznog gela s genomskom DNK. Linija 1 koncentrirana DNK, linija 2 razrijeđena DNK 1: 10, linija 3 razrijeđena DNK 1: 100, linija 4 lambda marker Hind III (BioLabs) Strelica pokazuje 10.000 bp. Izgled rendgenskog filma nakon hibridizacije prenesenog gela s pozitivnom VIM-DNK probom obilježenom  $^{32}\text{P}$  dCTP (fotografija je zaokrenuta u lijevo). Radioaktivni signal vidi se samo na položaju kromosomske DNK (signal plazmidne DNK nalazio bi se u području manjih molekularnih veličina).

## 6.15 SEKVENCIRANJE

### 6.15.1 SEKVENCIRANJE AMPLIKONA PCR REAKCIJE ZA GEN *bla*<sub>VIM</sub>

Reakcije određivanja slijeda nukleotida DNK u ampliconima PCR reakcija za amplifikaciju gena *bla*<sub>VIM</sub> urađene su pomoću kita ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. ready Reaction cycle Sequencing Kit. Slijed nukleotida iz svake reakcije obrađen je programom Bioedit te uspoređen s bazom nukleotidnih slijedova dostupnih na internetskoj adresi <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Sekvenciranje amplicona PCR reakcije za gen *bla*<sub>VIM</sub> dobijenih za izolate pod brojevima 3, 4, 5, 6, 43 i 178 pokazalo je da se radi o VIM-2 genu za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaze. Slika 29 prikazuje usporedbu redoslijeda nukleotidnih baza amplicona VIM gena nakon sekvenciranja s početnicom VIM DIA-F za izolat 4 (Query) i jedne od prijavljenih sekvenci u PubMed nukleotidnoj bazi podataka (Sbjct). U prijavljenoj sekvenci VIM-2 gen nalazi se u integronu klase 1, nazvanom In100. Njegov djelomični redoslijed nukleotidnih baza prijavljen je bazi podataka pod pristupnim brojem AY560837. Iz usporedbe je vidljivo da je redoslijed PCR produkta potpuno odgovarao redoslijedu nukleotidnih baza za gen *bla*<sub>VIM-2</sub> čiji je produkt VIM-2 metalo- $\beta$ -laktamaza.

```
Pseudomonas aeruginosa class 1 integron In100, partial sequence
Length=4003
Identities = 502/502 (100%), Gaps = 0/502 (0%)
Strand=Plus/Plus
/gene="blaVIM-2"/product="VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase"
527..1327
```

```

Query 1      TTGGTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCAGTCTACCCGTCCAATGGTCTCAT
60
Sbjct 685      TTGGTCGCATATCGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCAGTCTACCCGTCCAATGGTCTCAT
744

Query 61    TGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGC
120
Sbjct 745      TGTCCGTGATGGTGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGC
804

Query 121   GGCACTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATTGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCAC
180
Sbjct 805      GGCACTTCTCGCGGAGATTGAGAAGCAAATTGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCAC
864

Query 181   GCACTTTCATGACGACCGCGTCGGCGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAAC
240
Sbjct 865      GCACTTTCATGACGACCGCGTCGGCGGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAAC
924

Query 241   GTACGCATCACCGTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCA
300
Sbjct 925      GTACGCATCACCGTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCCACGCA
984

Query 301   CTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTCTT
360
Sbjct 985      CTCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTCTT
1044

Query 361   CTATCCTGGTGCTGCGCATTCGACCGACAACCTTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGT
420
Sbjct 1045     CTATCCTGGTGCTGCGCATTCGACCGACAACCTTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGT
1104

Query 421   GCTCTATGGTGGTTGTGCGATTTATGAGTTGTCACGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGA
480
Sbjct 1105     GCTCTATGGTGGTTGTGCGATTTATGAGTTGTCACGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGA
1164

Query 481   TGCCGATCTGGCTGAATGGCCC      502
Sbjct 1165     TGCCGATCTGGCTGAATGGCCC      1186

```

*Slika 29. Usporedba prijavljene sekvence produkta PCR reakcije za gen bla<sub>VIM</sub> za izolat 4 i postojeće sekvence (AY560837) u PubMed banci gena ("GenBank"). Redoslijed nukleotidnih baza odgovara sa 100% podudarnosti genu bla<sub>VIM-2</sub>.*

### **6.15.2 SEKVENCIJANJE AMPLIKONA PCR REAKCIJA ZA INTEGRON UNUTAR KOJEG JE GEN *BLA<sub>VIM</sub>***

S obzirom na dijelom poznati slijed gena unutar integrona prisutnog u indeks sojevima 1 i 2, za sekvenciranje produkta obje PCR reakcije korištene u amplifikaciji integrona, za svaki VIM pozitivan izolat koristili smo početnice navedene u poglavlju METODE, odnosno njihove kombinacije kako bi dobili sto potpuniji redoslijed nukleotidnih baza. Ovaj način mapiranja integrona još se naziva i "primer walking strategy" odnosno korištenje niza početnica za sekvenciranje dijela po dijela integrona uz niz preklapanja u slijedovima. Dio integrona od konzerviranog segmenta na 5' kraju i dijela VIM gena dobili smo koristeći kombinacije početnica upotrebljenih i u reakciji amplifikacije konzerviranog segmenta na 5' kraju. Za sekvenciranje preostalog dijela VIM gena, odnosno genske kazete koje se nalaze do konzerviranog segmenta integrona na 3' kraju koristili smo početnice koje osim amplifikacije VIM gena i 3' CS segmenta integrona amplificiraju oxa-10 i slične gene (5/10) te aacA4 gen, budući da su njihove varijante bile prisutne u prvootkrivenim metalo-β-laktamaza pozitivnim sojevima. Niz sekvencijskih reakcija unutar segmenta VIM-3'CS te kombinacija plus i minus lanca dobivenih uporabom kombinacija forward i reverse početnica omogućila je da za sve VIM pozitivne sojeve dobijemo potpuni slijed nukleotida od 3277 parova baza unutar integrona. Ovaj se slijed pokazao istim u svih VIM-pozitivnih izolata. Potpuni slijed

nukleotidnih baza u integronu koji sadržava gen za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaze VIM-2 je

sljedeći:

```

1  tntntagnaa aaccgaanga tgogaanac ttcattccggg gtcancaccg acgggcaagn
61  gccgcgaccg gcnagagtct tncgatctcc tgaanccagg gcanatccgt gcacagcacc
121  ttgncgtag  aagaacagca aggccgncaa tncctgacga tgctgggaga cngaaacctt
181  gcgctcgttc gccagccagg acagaaatgc ctcgacttcg ctgctgccc aaggttgccg
241  gtgacgcaca ccgtggaaac ggangaaggc acgaaccag  tggacataag cctgttcggt
301  tggtaagctg taatgcaagt agcgtatgcg ctcacgcaac tgggccagaa ccttgaccga
361  acgcagcggg gtaacggcg  cagtggcggg tttcattggct tgttatgact gttttttgt
421  acagtctatg cctcgggcat ccaagcagca agcgcgttac gccgtgggtc gatgtttgat
481  gttatggagc agcaacgatg ttacgcagca gggcagtcgc cctaaaacaa agttatggcg
541  cactcacccc catggagttt tgatgttcaa acttttgagt aagtatttgg tctatttgac
601  cgcgtctatc atggctattg cgagtcctcg cgctttttcc gtagatttca gcggtgagta
661  tccgacagtc agcgaatttc cggtcgggga ggtccgggctt taccagattg ccgatgggtg
721  ttggtcgcac atcgcaacgc agtcgtttga tggcgcagtc taccctcca atggtctcat
781  tgtccgtgat ggtgatgagt tgcttttgat tgatacagcg tggggtgoga aaaaacagc
841  ggcacttctc gcggagattg agaagcaaat tggacttctc gtaacgcgtg cagtctccac
901  gcactttcat gacgaccgcg tcggcggcgt tgatgtcctt cggcggcgtg ggggtggcaac
961  gtacgcatac ccgtcgacac gccggctagc cgaggtagag ggaacgaga ttcccacgca
1021 ctctctagaa ggactctcat cgagcgggga cgcagtgccg ttcggtccag tagaactctt
1081 ctatctgggt gctgcgcatt cgaccgacaa cttagtgtg taactccctg ctgcgagtgt
1141 gctctatggt ggtgtgcgca tttatgagtt gtcacgcacg tctgcgggga acgtggccga
1201 tgccgatctg gctgaatggc ccacctccat tgagcggatt caacaacact acccggaagc
1261 acagttctgc attccggggc acggcctgcc gggcggctca gacttgctca agcaacacac
1321 gaatgtgta  aaagcgcaca caaatgcctc agtcgttgag tagcaggcag atgcgcacata
1381 acatgaagtt qcagccgacc atcaactccg tgcgctccgt tctggcggct gaacttcggc
1441 gttagccacc aagaaggtgc catgaaaaa tttgcgcgat atgtaattat cgcgtgtctt
1501 tcgagtacgg cattagctgg tccaattaca gaaaatacgt cttggaacaa agagttctct
1561 gccgaagccg tcaatggtgt cttcgtgctt tgtaaaagta gcagtaaatc ctgcgctacc
1621 aatgacttag ctcgtgcac  aaaggaatat cttccagcat caacatttaa gatccccaac
1681 gcaattatgc gcctagaaac tgggtgctata aagaatgagc atcaggtttt caaatgggac
1741 ggaagccaa  gagccatgaa gcaatgggaa agagacttga ccttaagagg gcaatacaa
1801 gtttcagctg ttcccgtatt tcaacaaatc gccagagaag ttggcgaagt aagaatgcag
1861 aaatacctta aaaaattttc ctatggcaac cagaatatca gtggtggcat tgacaaattc
1921 tggttggaag gccagcttag aatttcgcga gttaatcaag tggagtttct agagtctcta
1981 ttttaaaata aattgtcagc atctaaagaa aaccagctaa tagtaaaaga ggctttggta
2041 atggagcggc cacctgaata tctagtgcac tcaaaaactg gttttctgg ttggggaact
2101 gagtcaaatc ctggtgtcgc atggtggggt ggggtgggtg agaaggagac agaggtttac
2161 tttttcgctt ttaacatgga tatagacaac gaaagtaagt tgccgctaag aaaaaccatt
2221 cccaccaaaa tcatggaaag tgagggcatc attggtggct aacaaagtcgc tcaaggtcgc
2281 tccctgcggt cgttggacag tcccagtcgg cgcagcttc  gcattttatg cgcgcctgt
2341 gcctaacctt tagctccaac gttagatgcc agatttggcg ttgctatgc tcacagaaaa
2401 tcgatagccg caagactggt tttggcaact catagccact acaatttctc ctccataacc
2461 tagagagatg tgcgcgtgaa acaaaagtta ggcatacaaa agtacagcat cgtgaccaac
2521 agcaacgatt ccgtcacact gcgcctcatg actgagcatg accttgcgat gctctatgag
2581 tggctaaatc gatctcatat cgtcagatgg tggggcggag aagaagcacg cccgacactt
2641 gctgacgtac aggaacagta cttgccaaag gttttagcgc aagagtcctg cactccatac
2701 attgcaatgc tgaatggaga gccgatttgg tatgcccagt cgtacgttg tcttggaaac
2761 ggggacggat ggtgggaaga agaaaccgat ccaggagtac gcggaataga ccagtcactg
2821 gcgaatgcat cacaactggg caaaggcttg ggaaccaagc tggttcagac tctggttgag
2881 ttgctgttca atgatccga ggtcaccaag atccaaacgg acccgtgcc gagcaacttg
2941 cgagcgtacc gatgctacga gaaagcggg tttgagagc aaggtaccgt aaccaccca
3001 gatgttccag ccgtgtacat gtttcaaaa cgccaggcat tcgagcgaac acgcagtgtt
3061 ccctaaccct tccatcgagg gggacttcca agggctggcg cccttggccg cccctagtgt
3121 caaacgttag atgcactaag cacataatg ctcacagcca aactatcagg tcaagtctgc
3181 ttttattatt ttaagcgtg cataataagc cctacacaaa ttgggagata tatc atgaaa
3241 ggcttcatga ttgccgatgg ntttgatntg tattccc (3277)

```

Po ovom slijedu nukleotida i prijavljenim slijedovima nukleotidnih baza unutar genske baze PubMed-a zaključili smo da se unutar integrona klase 1 nalaze gen-integraza, gen VIM-2 (metalo- $\beta$ -laktamaza), gen oxa-10 (oksacilinaza), parcijalni gen qacF (rezistencija na kvarterne amnijeve spojeve), gen aac6'-Ib i gen qacEdelta1 (rezistencija na kvarterne amonijeve spojeve). Isti redoslijed može se detaljno prikazati kako slijedi: na početku reda je redni broj nukleotidne baze iz gore navedenog slijeda s kojim započinje pojedini gen ili dio integrona te redni broj baze s kojom završava pojedini gen, odnosno genska kazeta ili mjesto. Prva genska kazeta započinje s attI rekombinacijskim mjestom i završava inverznim središnjim mjestom, a svaka sljedeća počinje tzv. središnjim mjestom, odnosno "core site" te završava inverznim središnjim mjestom ("inverse core site"), kao dijelom tzv. 59-be, odnosno attC mjesta (u slijedu gore podcrtano).

1..532 5' konzervirani dio

1..396 gen **intI**/funkcija: „**integraza-rekombinaza**“

282..311 promotor Pc

282..287 -35 signal Pc

306..311 -10 signal Pc

401..406 -35 signal P2

420..426 -10 signal P2

481..538 **attI** rekombinacijsko mjesto

482..488 slabo vezujuće mjesto integreze DR 2

501..507 jako vezujuće mjesto integreze DR1

517..542 jednostavno mjesto ("simple site")

533..1441 genska kazeta blaVIM-2

533 ..539 središnje mjesto ("core site")/funkcija insercija-ekscizija

533..1363 gen **blaVIM-2**/funkcija: „**metalo- $\beta$ -laktamaza**“

1376..1382 inverzno središnje mjesto („inverse core site“)

1376..1440 VIM-2 59 be

1441..1447 središnje mjesto („core site“)

1462..2262 genska kazeta **blaOXA-10**/funkcija: **oksacilinaza 10**

2257..2263 inverzno središnje mjesto („inverse core site“)

2257..2360 OXA-10 59 be

2361..2367 središnje mjesto („core site“)  
 2362..2487 genska kazeta s genom **qacF**/funkcija: rezistencija na kvarterne amonijeve spojeve  
 2487..2493 središnje mjesto („core site“)  
 2488..3126 genska kazeta aacA4  
 2548..3066 gen **aacA4**/funkcija: **aminoglikozid-modificirajući enzim aac6'-Ib**  
 3061..3067 inverzno središnje mjesto („inverse core site“)  
 3061..3126 aacA4 59 be  
 3127..3133 središnje mjesto („core site“)  
 3127..3277 3' konzervirani dio  
 3235..3277 gen **qacEdelta1**/funkcija: rezistencija na kvarterne amonijeve spojeve

Slijed je prijavljen nukleotidnoj bazi podataka EMBL/GenBank pod brojem AM392427. Budući da se radi o do sada neprijavljenom redoslijedu genskih baza unutar integrona, integron je potpuno novi i nazvan InCRO.

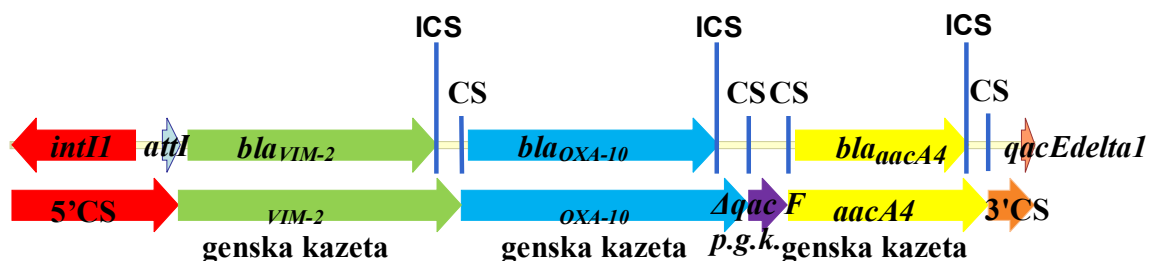
Dobijeni integron klase 1 s genskim kazetama VIM-2, OXA-10, qacF, aacA4 prikazuje shematski Slika 30.

## 6.16 USPOREDBA MBL POZITIVNIH IZOLATA

Svi MBL pozitivni izolati imali su serotip O11 s izuzetkom izolata rednog broja 43 koji je imao serotip O12. Dva indeks izolata 1 i 2 nisu se mogli tipizirati komercijalno dostupnim serumima. Iako su svi sojevi koji su sadržavali gen za enzim metalo- $\beta$ -laktamazu bili multiplerezistentni, postojale su razlike u osjetljivosti, kako na  $\beta$ -laktame, tako i na antipseudomonasne antibiotike iz ostalih skupina. Svi MBL pozitivni izolati bili su otporni na ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramicin (podatci nisu prikazani), netilmicin i amikacin kao što prikazuje Tablica 26.

## Integron InCRO

3277 bp



**Slika 30. Shematski prikaz integrona koji sadržava VIM-2 gensku kazetu.**

U gornjem redu su geni; smjer strelica u gornjem redu označava smjer prepisivanja gena. U donjem redu su prikazani osnovni dijelovi integrona - konzervirani 5' i 3' kraj te između njih varijabilni dio s genskim kazetama: integron je klase 1 i ima 4 genske kazete; iza položaja integraze-rekombinaze *attI* nalazi se prva genska kazeta s genom za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaze VIM-2. Slijedi genska kazeta s genom za proizvodnju  $\beta$ -laktamaze OXA-10, potom parcijalna genska kazeta s dijelom gena *qacF* čiji bi protein posredovao rezistenciju na kvarterne amonijeve dezinficijense; slijedi genska kazeta s genom *aacA4* koji proizvodi aminoglikozid-modificirajući enzim *aac6'-Ib*. Posljednji gen je *qacEdelta1* unutar 3' konzerviranog kraja čiji produkt također posreduje rezistenciju na dezinficijense. Pristupni broj integrona u EMBL/GenBank je *AM392427*.

Izolati 3, 4, 5 i 6 bili su osjetljivi na piperacilin i piperacilin s tazobaktamom te umjereno osjetljivi na aztreonam (izolat 5 bio je otporan). Ovi izolati bili su otporni i na sve aminoglikozide te osjetljivi na kolistin. Dakle izolati 3-6 pripadali su rezistotipu 4. Izolat 43 bio je osjetljiv na piperacilin s tazobaktamom i umjereno osjetljiv na aztreonam te osjetljiv na



kolistin. Svrstan je također u rezistotip 4. Izolat 178 bio je osjetljiv na aztreonam pa je pripadao rezistotipu 1. Može se dakle zaključiti da su po rezistotipu izolati 3-6 bili sličniji od izolata 43 i 178.

Također treba napomenuti da su minimalne inhibicijske koncentracije interpretirane po CLSI standardima pa primjerice za piperacilin MIK od 64 µg/ml znači da je izolat osjetljiv, a već sljedeća koncentracija od 128 µg/ml označava otporan (uz dopušteno odstupanje u mikrodilucijskoj metodi od jednog razrijeđenja). Isti takav odnos postoji i za piperacilin s tazobaktamom.

Svi MBL pozitivni izolati imali su odnos minimalnih inhibicijskih koncentracija prema karbenicilinu, cefotaksimu, ceftazidimu i piperacilinu koji je govorio u prilog efluksa, i svi su, s izuzetkom izolata 178 pokazivali smanjenje MIK-a ceftazidima u prisustvu fenilboronične kiseline za više od 4X (izolat 178 pokazivao je dvostruko smanjenje). Ni jedan od MBL pozitivnih sojeva nije imao OprD u vanjskoj membrani.

Svi MBL izolati bili su rezistentni na fluorokinolone i aminoglikozide.

Na temelju PFGE analize MBL pozitivnih sojeva računalnim programom GelCompar dobijen je dendrogram istih, kao što prikazuje Slika 31.

Može se uočiti da se među MBL izolatima nalaze dva osnovna klonska tipa - tip Ambl u koji spadaju izolati 5, 4, 6 i 3, pri čemu su izolati 4 i 5 podtipa Ambl1 (slični 95%), izolat 6 podtipa Ambl2, a izolat 3 podtipa Ambl3. Drugi klonski tip Bmbl čine izolati 1 i 43 (slični 82%), dok izolati 178 i 2 nisu genetski srodni preostalima.

Naime, izolat 178 nešto je srodniji klonskom tipu Ambl, kojem nalikuje 75%, dok je izolat 2 srodniji klonskom tipu Bmbl uz koeficijent sličnosti od 75%.

**Tablica 26. Osjetljivost MBL pozitivnih izolata *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike (MIK u µg/ml).**

Izolat	PIP	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	GN	NET	AN	COL	CIP
3	32	32	128	32	16	>128	>128	>128	>128	128	2	32
4	64	64	128	32	16	>128	>128	>128	>128	64	2	32
5	32	64	128	32	32	>128	>128	>128	>128	128	2	64
6	32	64	128	32	16	>128	>128	>128	>128	128	2	32
43	>128	64	32	32	16	>128	>128	>128	>128	32	2	32
178	128	>128	64	32	8	128	128	>128	>128	32	2	32

\* Plavim fontom označena je vrijednost osjetljiv, narančastim umjereno osjetljiv, ostalo je otporan.

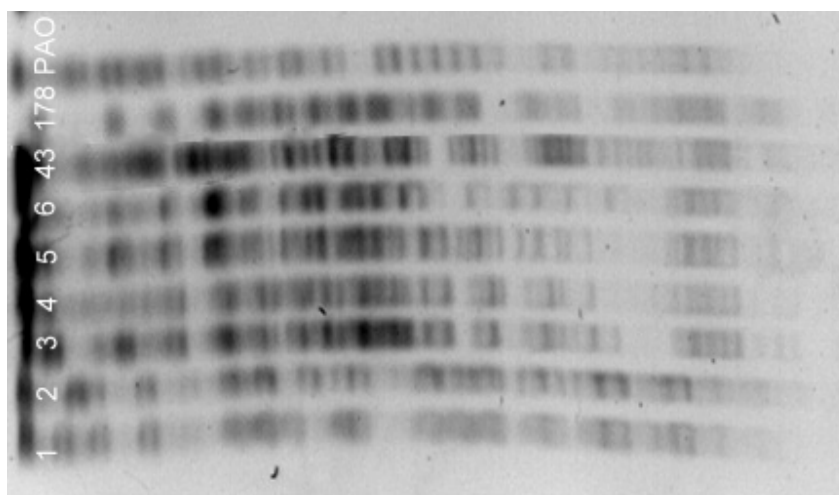


**Slika 31. Dendrogram MBL pozitivnih izolata s uključenim indeks sojevima 1 i 2 (*Xba*I enzim).**

Uz koeficijent sličnosti  $\geq 80\%$  izolati 3-6 pripadaju jednom klonskom tipu, a izolati 1 i 43 drugom.

Izolati 178 i 2 nisu klonski srodni preostalima.

S obzirom na značaj pravilne interpretacije MBL pozitivnih sojeva, a vezano za njihovo genetsko podrijetlo i genetsku srodnost, genotipizacija ovih sojeva urađena je dodatno PFGE metodom koristeći specifičniji restriksijski enzim *SpeI*. Na Slici 32 prikazani su dobiveni PFGE profili MBL pozitivnih sojeva s uključenim indeks sojevima i PAO kontrolnim sojem. Iz analize vrpce može se zaključiti da izolati 1 i 2 pripadaju jednom klonskom tipu (A), dok izolati 3-6 i 178 pripadaju drugom klonskom tipu (B), pri čemu izolati 3-5 i 178 pripadaju podtipu B1, izolat 6 podtipu B2. Izolat 43 predstavlja treći genetski tip C.

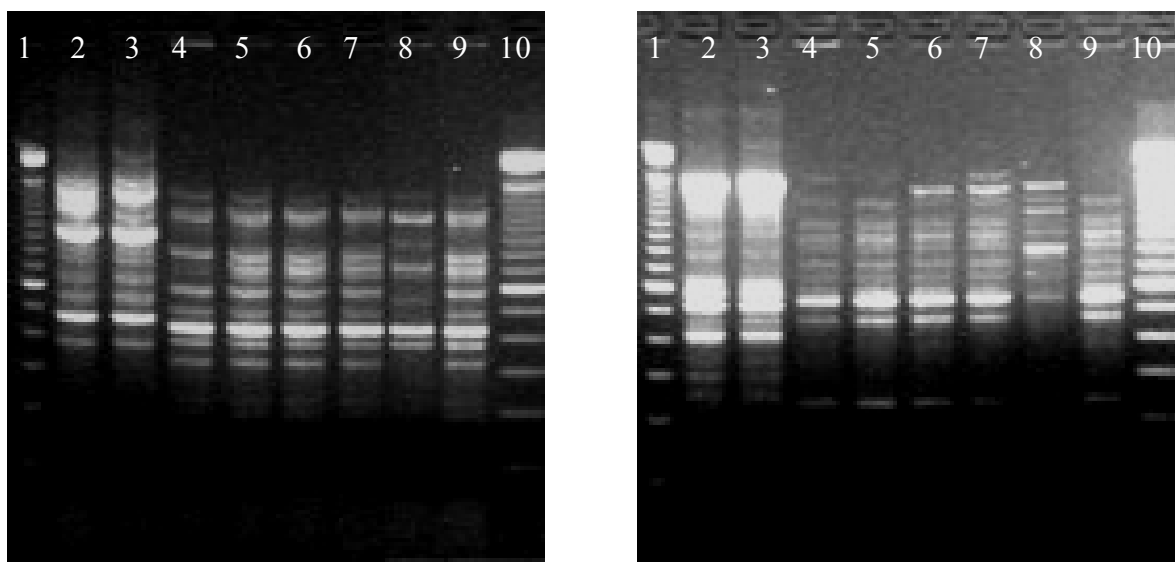


**Slika 32. PFGE profili MBL pozitivnih izolata cijepanih *SpeI* restriksijskom endonukleazom**

Reakcija amplifikacije polimorfne DNK provedena je s početnicama 208 (5' ACGGCCGACC) i 272 (5' AGCGGGCCAA) u reakcijskoj otopini s Taq polimerazom (Invitrogen). Indeks sojevi

1 i 2 pripadali su RAPD tipu A, sojevi 3-6, i 178 RAPD tipu B, a soj 43 RAPD profilu C bez obzira koje su početnice upotrebljene.

Stoga se, uspoređujući podatke dobivene PFGE uz restrikcijsku endonukleazu *Xba*I, PFGE s restrikcijskom endonukleazom *Spe*I te RAPD s početnicama 208 i 272 može reći da izolati 1 i 2 koji su indeks MBL pozitivni sojevi predstavljaju klonski kompleks jednog genetskog porijekla, a izolati 3, 4, 5, 6 i 178 klonski kompleks drugog genetskog porijekla. Izolat 43 nije srodan preostalima. Ove se usporedbe lakše uočavaju prikazom u Tablici 27.



**Slika 33. RAPD - profili MBL pozitivnih sojeva s početnicama 208 (lijevo) i 217 (desno).**

Linija 1- MWM, linija 2 indeks soj 1, linija 3 indeks soj 3, linija 4 soj 3, linija 5 soj 4, linija 6 soj 5, linija 7 soj 6, linija 8 soj 43, linija 9 soj 178, linija 10-MWM.

**Tablica 27. Profili MBL pozitivnih sojeva dobijeni različitim metodama genotipizacije.**

Metoda	PFGE <i>Xba</i> I	PFGE <i>Spe</i> I	RAPD 208	RAPD 272
<b>Izolat</b>				
1	B1	C1	C	C
2	D	C2	C	C
3	A2	A1	A	A
4	A1	A1	A	A
5	A1	A1	A	A
6	A1	A2	A	A
43	B2	B	B	B
178	C	A1	A	A

## 6.17 PROVJERA IDENTIFIKACIJE VRSTE ZA MBL POZITIVNE IZOLATE

Budući da indeks sojevi nisu pripadali istom klonu po PFGE metodi, a serotipizacijom nisu aglutinirali sa specifičnim serumima za *P. aeruginosa*, odlučili smo provjeriti identifikaciju indeks sojeva VITEK 2 automatiziranim sustavom te dodatno molekularnom metodom dokaza visoko specifičnog gena *ecfX* koji kodira ECF, odnosno ekstracitoplazmatski funkcijski sigma faktor koji je specifičan za *P. aeruginosa*.

Testiranjem na VITEK 2 automatiziranom sustavu indeks izolati su identificirani kao *Pseudomonas putida* s 99% vjerojatnosti.

Amplifikacija *ecfX* gena nije dala amplikon za indeks sojeve 1 i 2, dok se svim ostalim izolatima dokazao gen *ecfX*, kao i pozitivnoj kontroli, odnosno izolatu PAO1.

## **6.18 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA O BOLESNICIMA S ANKETNOG LISTIĆA S OBZIROM NA DULJINU HOSPITALIZACIJE I ISHOD**

Medijan duljine hospitalizacije svih bolesnika bio je 39 dana (1-365 dana), pri čemu je medijan hospitalizacije za muške bolesnike (N=80) bio 42 dana (1-365), a za ženske (N=46) 30 dana (1-365). Djeca muškog spola (N=8) prosječno su hospitalizirana 124 dana (17-365), a ženskog (N=11) 67,5 dana (31-365). Dječja populacija bolesnika imala je većinom dijagnozu kronične bolesti organskog sustava te nisu razmatrani u statističkoj obradi utjecaja varijabli na duljinu hospitalizacije i ishod bolesnika.

Razlika u duljini hospitalizacije, a s obzirom na varijable koje su se mogle pratiti iz anketnog listića (Prilog 1), testirana je Mann-Whitneyevim testom i prikazana u Tablici 28. Testiran je utjecaj spola, primanja fluorokinolona, cefalosporina ili karbapenema prije izolacije pseudomonasa analiziranog u ovom radu, terapije dane poslije izolacije pseudomonasa, boravak u jedinici intenzivnog liječenja, osnovne dijagnoze te serotipa i rezistotipa na duljinu liječenja (a time neizravno i na cijenu koštanja liječenja).

Iz Tablice je vidljivo da su muškarci bili dulje hospitalizirani od ženskih bolesnika, pri čemu je razlika u duljini hospitalizacije s obzirom na spol na granici statističke značajnosti ( $z=1,96$ ;  $p=0,05$ ). Bolesnici koji su primali fluorokinolone prije izolacije otpornog pseudomonasa nešto su dulje bili hospitalizirani u odnosu na one koji nisu; i ova je razlika bila na granici statističke značajnosti ( $z=1,86$ ;  $p=0,06$ ). Cefalosporinska terapija prije izolacije pseudomonasa otpornog na karbapeneme nije statistički značajno utjecala na duljinu hospitalizacije, kao ni terapija

karbapenemima. Terapija koja je bila djelotvorna, odnosno po antibiogramu djelovala na izoliranog pseudomonasa nije imala statistički značajan utjecaj na duljinu hospitalizacije bolesnika. Boravak u jedinici intenzivnog liječenja značajno je utjecao na duljinu hospitalizacije bolesnika pa su značajno kraće bili hospitalizirani oni bolesnici koji nisu dio hospitalizacije proveli u JIL-u ( $z=1,38$ ;  $p=0,04$ ). Serotip 11 i serotip 12, koji su predstavljali dva najčešće izolirana serotipa pseudomonasa nisu značajno utjecali na duljinu hospitalizacije, kao ni izolacija najčešćeg rezistotipa, odnosno rezistotipa 1, iako je hospitalizacija bila dulja u bolesnika koji su u uzorcima imali *P. aeruginosa* rezistotipa I, odnosno serotipa 12, u odnosu na ostale rezistotipove i serotipove. Kao što je i očekivano bolesnici s kroničnom dijagnozom bili su dulje hospitalizirani od onih s akutnom, ali statistički bez značajne razlike ( $z=0,93$ ;  $p=0,35$ ).

Analiziran je i utjecaj niza varijabli na konačan ishod hospitalizacije odraslih bolesnika prikazan kao preživljavanje i smrt (Tablica 29). U varijanti preživljavanje prikazani su bolesnici koji su otpušteni u stanju poboljšano ili nepromijenjeno.

Medijan dobi odraslih bolesnika koji su preživjeli bio je 58 godina (18-85), a umrlih 66 godina (21-83). Statistički gledano razlika je bila na granici značajnosti ( $z=1,87$ ;  $p=0,06$ ). Statistički nije bilo značajne razlike u duljini hospitalizacije odraslih bolesnika, a s obzirom na ishod.

Naime, medijan duljine hospitalizacije preživjelih bolesnika bio je 33 dana (1-221), a umrlih 39 dana (1-104). S obzirom na velike raspone, razlika ovih medijana nije bila statistički značajna ( $z=0,005$ ;  $p=0,99$ )

**Tablica 28 . Prikaz medijana te minimalnih i maksimalnih vrijednosti duljine hospitalizacije (u danima) odraslih bolesnika, a s obzirom na različite varijable. Istaknute su statistički značajne razlike.**

<b>Varijabla</b>	<b>DA</b>	<b>NE</b>	<b>z*</b>	<b>p</b>
<b>Spol M</b>	<b>39,5 (1-221)</b>	<b>24 (1-134)</b>	<b>1,96</b>	<b>0,05</b>
Karbapenemi u terapiji	44 (1-221)	32,5 (1-134)	1,48	0,13
Cefalosporini u terapiji	35,5 (7-123)	36 (1-221)	0,17	0,87
Fluorokinoloni u terapiji	24 (1-123)	40,5 (2-221)	1,86	0,06
Terapija prema antibiogramu	37 (12-134)	34 (1-203)	0,82	0,41
<b>Boravak u JIL-u</b>	<b>37 (6-134)</b>	<b>24 (1-203)</b>	<b>1,38</b>	<b>0,04</b>
Serotip 11	29 (1-203)	36 (5-134)	0,23	0,86
Serotip 12	38,5 (5-134)	28 (1-203)	0,90	0,37
Rezistotip I	40 (1-123)	30,5 (1-221)	0,87	0,39
Dijagnoza akutna	31 (2-134)	41,5 (1-221)	0,93	0,35

\* Mann-Whitneyev test

Spol bolesnika nije imao značajan utjecaj na njihovo preživljavanje, iako je u skupini umrlih bolesnika bilo češće onih muškog spola. Terapija fluoriranim kinolonima imala je u konačnici utjecaj na dužu hospitalizaciju odraslih bolesnika, međutim, prisustvo karbapenema,



cefalosporina i fluorokinolona u terapiji prije izolacije karbapenem-otpornog pseudomonasa nije imalo značajan utjecaj na ishod bolesnika.

S druge strane, prisustvo centralnog venskog katetera (CVK) imalo je značajan utjecaj na veću smrtnost ( $\chi^2=4,57$ ;  $p<0,05$ ), što nije vrijedilo za prisustvo urinskog katetera (UK), mehaničke ventilacije (MV) ili drugih biomaterijala. Boravak u JIL-u također nije imao statistički značajan utjecaj na ishod bolesnika, kao ni operacijski zahvat tijekom hospitalizacije u kojoj je izoliran prikupljeni soj. Akutna ili kronična dijagnoza bolesnika nisu imali značajan utjecaj na preživljavanje kao ni rezistotip, odnosno serotip izoliranog soja pseudomonasa. Zanimljivo je da terapija prema antibiogramu ("ciljana") za izolirani soj pseudomonasa nije imala statistički značajan utjecaj na konačan ishod bolesnika.

**Tablica 29. Utjecaj različitih varijabli (izražen kao broj i postotak od ukupnog broja odraslih bolesnika za koje smo imali podatke) na konačan ishod bolesnika.**

Varijabla	Preživljavanje	Smrt	$\chi^2$	p
Spol - M (N=86)	49 (65,3)	37 (72,5)	0,73	0,39
- Ž (N=40)	26 (34,7)	14 (27,5)		
Karbapenemi u terapiji (N=31)	18 (30,0)	13 (32,5)	0,07	0,79
- DA				
- NE (N=69)	42 (70,0)	27 (67,5)		
Cefalosporini u terapiji (N=25)	16 (25,4)	9 (22,5)	0,11	0,74
- DA				
- NE (N=78)	47 (74,6)	31 (77,5)		
Fluorokinoloni u terapiji (N=23)	12 (21,4)	11 (24,4)	0,13	0,71
- DA				
- NE	44 (78,6)	34 (75,6)		

(N=78)					
Ciljana terapija	18 (33,3)	15 (41,7)	0,65	0,42	
- DA (N=33)					
- NE (N=57)	36 (66,7)	21 (58,3)			
Boravak u JIL-u	51 (68,9)	36 (69,2)	0,04	0,84	
- DA (N= 87)					
- NE (N=39)	23 (31,1)	16 (30,8)			
MV - DA	28 (37,8)	25 (49,0)	1,54	0,21	
- NE	46 (62,2)	45,7 (51,0)			
UK - DA (N=59)	31 (41,0)	28 (54,9)	2,5	0,11	
- NE (N=67)	44 (59,0)	23 (45,1)			
<b>CVK - DA</b>	<b>21 (28,4)</b>	<b>24 (47,1)</b>	<b>4,57</b>	<b>0,03</b>	
(N=45)					
- NE	<b>53 (71,6)</b>	<b>27 (52,9)</b>			
(N=80)					
Drugi biomaterijali	18 (24,7)	13 (25,5)	0,11	0,91	
- DA (N=31)					
- NE (N=93)	55 (75,3)	38 (74,5)			
Operacijski zahvat - DA	40 (54,1)	20 (39,2)	2,66	0,10	
(N=60)					
- NE	34 (45,9)	31 (60,8)			
(N=65)					
Serotip	11 13 (19,4)	8 (17,4)	0,07	0,78	
(N=21)					
Ostali serotipovi	54 (80,6)	38 (82,6)			
(N=92)					
Serotip	12 44 (65,7)	31 (67,4)	0,04	0,85	
(N=75)					
Ostali serotipovi	23 (34,3)	15 (32,6)			
(N=38)					
Rezistotip	1 39 (51,3)	28 (56,0)	0,003	0,96	
(N=67)					
Ostali rezistotipovi	37 (48,7)	22 (44,0)			
(N=59)					
Dijagnoza akutna (N=67)	42 (55,3)	25 (50,0)	0,44	0,50	
Dijagnoza kronična (N=59)	34 (44,7)	25 (50,0)			

## 7 RASPRAVA

Stvaranje  $\beta$ -laktamaza najčešći je mehanizam rezistencije u Gram-negativnih bakterija. Stečene karbapenemaze, uključujući metalo- $\beta$ -laktamaze od izuzetne su kliničko-epidemiološkog značaja s obzirom na široki supstratni profil (koji uključuje cefalosporine proširenog spektra djelovanja te karbapeneme) i neosjetljivost na tržišno raspoložive serinske inhibitore  $\beta$ -laktamaza. *Pseudomonas aeruginosa* je među Gram-negativnim patogenima bakterija koja najčešće stječe metalo- $\beta$ -laktamaze kao još jedan odgovor na međuigru s okolišem koji je okružuje, odnosno sve većom prisutnošću karbapenema u terapiji rezistentnih bolničkih patogena.<sup>77,79,151,152</sup> Od 1991. godine, kada je Japan<sup>49</sup> prvi izvijestio o metalo- $\beta$ -laktamazi u *Pseudomonas aeruginosa* za koju se kasnije utvrdilo da je riječ o IMP enzimu, većina europskih zemalja izvijestila je o prisustvu uglavnom VIM-1 i VIM-2 metalo- $\beta$ -laktamaze u ovog patogena<sup>52,61,96</sup>. Hrvatska se priključila popisu europskih zemalja s VIM-2 tipom MBL 2003. godine.<sup>120</sup> Opisana su tada dva klonski srodna izolata *P. aeruginosa* iz KBC Split detektirana 2000. godine, a rezistentna na sve  $\beta$ -laktamske antibiotike s izuzetkom aztreonama. Za izolate je utvrđeno da posjeduju kromosomsku, integronom kodiranu MBL VIM-2 tipa. Još četiri *P. aeruginosa* izolata s dokazanom VIM-2 MBL opisana su 2006. godine iz KBC Zagreb.<sup>121</sup> Istraživanje je tada obuhvatilo 100 izolata sa smanjenom osjetljivošću na imipenem ili meropenem iz razdoblja od 2002. do 2005. godine prikupljenih iz KBC Zagreb i Sveučilišne bolnice Merkur, Zagreb. Genetska osnova detektiranih MBL enzima nije opisana, a izolati nisu bili klonski srodni.

U ovoj disertaciji istraženo je 169 bolničkih izolata *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na karbapeneme koji su prikupljeni u rutinskom laboratorijskom radu u KBC Split u razdoblju od

2001. do 2007. godine s ciljem utvrđivanja kliničko-epidemiološkog značaja onih izolata koji luče metalo- $\beta$ -laktamaze.

Zbirka od ukupno 169 izolata pripadala je 145 bolesnika. I u ovoj studiji se potvrdila činjenica da su nerijetko bolesnici kolonizirani (i/ili inficirani) s nekoliko različitih izolata *P. aeruginosa*.<sup>153,154</sup> Tako je ukupno 126 bolesnika imalo po jedan izolat, 15 bolesnika imalo je po dva izolata, troje bolesnika po tri izolata i jedan bolesnik imao je četiri različita izolata pseudomonasa. Iako su se izolati razlikovali po antibiogramu (budući da u zbriku po definiciji nisu ulazili sojevi duplikati od istog bolesnika - dakle oni s istim antibiogramom izolirani u razdoblju unutar 30 dana), kasnije se ispostavilo da su različiti i po genotipu pa su analizirani kao različiti. Od ukupno 19 bolesnika s multiplim izolatima petero su bila djeca. Već su raniji radovi pokazali učestalo nalaženje izolata *P. aeruginosa* s različitim anibiogramom, u djece s kroničnim respiratornim bolestima.<sup>155</sup> Većina bolesnika (63;42%) bila je hospitalizirana u jedinicama intenzivnog liječenja, bilo općim, bilo kirurškim. Ovaj podatak je očekivan budući da je poznato da *P. aeruginosa* spada u najčešće Gram-negativne bacile izolirane iz uzoraka bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja.<sup>156,157</sup> Drugi po zastupljenosti među odraslim bolesnicima (19;13%) bili su oni s Klinike za plućne bolesti što je u skladu s poznatom činjenicom da se *P. aeruginosa* najčešće izolira upravo iz respiratornog trakta, a posebice u bolesnika s kroničnim plućnim bolestima.<sup>158</sup> Ovu tvrdnju potvrđuje i raspodjela izolata po uzorcima, s obzirom da je 95 od 169 (56,2%) sojeva potjecalo iz uzoraka donjeg dijela respiratornog sustava (sputum, brisevi kanile, aspirati traheje i bronha). U europskoj studiji prevalencije patogena u jedinicama intenzivnog liječenja (EPIC), *P. aeruginosa* bio je dominantan Gram-negativan patogen izoliran iz bronhopulmonalnih uzoraka bolesnika iz 1417 jedinica intenzivnog liječenja 17 zemalja Zapadne Europe.<sup>159</sup> Drugi po učestalosti u ovoj

disertaciji bili su izolati pseudomonasa iz obrisaka rana (27 izolata; 16%), potvrđujući dobro poznatu činjenicu o ulozi *P. aeruginosa* u infekcijama kože i potkožnog tkiva, bilo da se radi o postoperativnim infekcijama kirurških rana, infekcijama opečene kože ili kroničnim kožnim promjenama.<sup>160-162</sup> Sljedeći po učestalosti bili su uzorci urina što je također očekivano budući da je *P. aeruginosa* značajan uzročnik nozokomijalnih urinarnih infekcija, posebice onih povezanih s uporabom urinskih katetera. Ove infekcije čine oko 40% svih nozokomijalnih infekcija i vrlo su često izvor Gram-negativne bakterijemije u hospitaliziranih bolesnika.<sup>163</sup>

Medijan dobi odraslih bolesnika bio je 65 godina, a većina bolesnika bolovala je od kroničnih bolesti što smo i očekivali budući da su ekstremi dobi - dakle najmlađa i najstarija dob najosjetljiviji za infekciju ovim uzročnikom te da pseudomonas rjeđe uzrokuje infekcije u zdravih osoba.<sup>164,165</sup> Shodno raspodjeli uzoraka, razlog slanja uzoraka na mikrobiološku obradu bile su većinom dijagnoze vezane za respiratorni sustav (u 54 - 47% odraslih bolesnika) te infekcije kirurškog mjesta (u 36 - 31% odraslih bolesnika). Iako je sasvim upitno da li izolacija pseudomonasa iz ekspektoriranog sputuma ili trahealnog aspirata indicira njegovu uzročnu vezu u infekcijama respiratornog sustava, brojne su studije u selekcioniranim populacijama bolesnika i analizirajući izolate bronhoalveolarnih lavata i zaštićenih uzoraka četkice iz donjih respiratornih putova, dokazale upravo da je *P. aeruginosa* vodeći Gram-negativan patogen u nozokomijalnim pneumonijama, posebice u ventiliranih bolesnika.<sup>166,167</sup> Što se infekcija kirurškog mjesta tiče, u literaturi se najčešće citiraju podaci Američke studije o praćenju nozokomijalnih infekcija u kojoj je *P. aeruginosa* na četvrtom mjestu među uzročnicima kirurške rane.<sup>168</sup> Infekcije su nešto češće u kardiokirurških bolesnika, a izvor infekcije osim bolesnika samog može biti i u operacijskoj sali, poput pumpe za sukciju, monitoringa arterijskog tlaka, otopine dezinficijensa i slično.<sup>167</sup>

Najveći broj izolata, njih 99, odnosno 58,6% od ukupnog broja te 65,6% od ukupnog broja tipabilnih izolata, imalo je serotip O12. Drugi po učestalosti bio je serotip O11 (29 izolata; 17,1% od ukupnog broja te 19,2% od ukupnog broja tipabilnih sojeva). Slijedili su ih po zastupljenosti serotipovi O1 (7; 4,1%), O3 (4; 2,4%) te O5 (3; 1,8%). Serotipovi O6, O8 i O10 bili su sporadično prisutni, dok serotipovi O2, O7, O9 i O15 nisu uopće bili prisutni u zbirci izolata ove studije. Pred gotovo 20 godina serotip O12 *Pseudomonas aeruginosa* bio je dominantan izolat u Europi uz prevladavajuću PSE-1  $\beta$ -laktamazu.<sup>169</sup> Danas se serotip O12 povezuje uglavnom s multiplerezistentnim pa tako i VIM-pozitivnim izolatima.<sup>114,170</sup> U istraživanju provedenom 2001. godine u Hrvatskoj, serotip O11 *P. aeruginosa*, koji je u ovoj disertaciji bio odmah iza serotipa O12, bio je najučestaliji, a slijedio ga je serotip O6, koji se u zbirci analiziranoj u ovoj disertaciji samo sporadično pojavljivao.<sup>171</sup> Moguće da razlike u prevalenciji serotipova potječu od razlika u antimikrobnoj osjetljivosti budući je ova disertacija obuhvatila samo imipenem-rezistentne izolate, a u studiji Vraneš i sur.<sup>171</sup> nema podataka o antimikrobnoj osjetljivosti. U nedavno objavljenoj studiji u Sloveniji najčešći serotipovi također su bili O11 i O6, pri čemu je oko 10% izolata bilo rezistentno na imipenem.<sup>172</sup> U nacionalnoj studiji u Španjolskoj, najučestaliji serotipovi *P. aeruginosa* bili su O1, O4 i O11.<sup>173</sup> Serotip O1 koji prevladava u Španjolskoj nalazi se među analiziranim izolatima u ovom radu na trećem mjestu po učestalosti. Da opisana raspodjela po serotipovima nije samo karakteristika europskih izolata *P. aeruginosa*, pokazala je i studija u SAD-u koja je analizirala 200-ak izolata *P. aeruginosa* regionalne bolnice u jednogodišnjem razdoblju u kojoj je većina izolata imala serotip O11, izolati serotipa O12 uopće nisu opisani, a 15% izolata bilo je netipabilno.<sup>174</sup> Rezultati ove disertacije slažu se i s rezultatima osmogodišnje studija u Francuskoj koja je utvrdila da su multiplerezistentni izolati *P. aeruginosa* bili upravo O11 i O12 serotipa, kao i

nedavno istraživanje u Grčkoj koje je obuhvatilo multiplorezistentne izolate *P. aeruginosa* koji su većinom bili serotipa O11, a zatim O12.<sup>175-177</sup> Netipabilnih izolata u ovoj je disertaciji bilo 18 tj. 10,6% što se slaže s literaturnim podacima za pseudomonasa, s obzirom da je od ranije poznato da pseudomonas često nema ispoljen lipopolisaharid vanjske membrane.<sup>178,179</sup>

Najpotentniji antibiotici u ovoj disertaciji bili su amikacin (62,1% osjetljivih izolata u disk difuzijskoj metodi, 82,8% osjetljivih izolata u mikrodilucijskoj metodi) i kolistin (95,7% osjetljivih izolata u disk difuzijskoj metodi, 50% osjetljivih izolata u mikrodilucijskoj metodi), a slijedili su ih ceftazidim, piperacilin s tazobaktamom i ciprofloksacin. Minimalna inhibicijska koncentracija potrebna za inhibiciju 90% izolata *P. aeruginosa* (MIK<sub>90</sub>) bila je za amikacin 32 µg/ml, a za kolistin 8 µg/ml. U studiji Higgins i sur.<sup>180</sup> koja je obuhvatila 86 imipenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa*, najpotentniji antibiotik bio je također amikacin s oko 70% osjetljivih izolata (MIC<sub>90</sub> >64 µg/ml), a slijedio ga je ceftazidim s 40% osjetljivih izolata (MIC<sub>90</sub> >64 µg/ml). Najmanje učinkovit antibiotik u studiji Higgins i sur. bio je piperacilin sa 76% rezistentnih izolata te gentamicin sa 72% rezistentnih izolata, dok je u ovoj disertaciji najveći broj rezistentnih izolata zabilježen također za gentamicin (84% u mikrodilucijskoj metodi).<sup>180</sup> Zbog učinkovitosti prema multiplorezistentnim izolatima, naglašava se upravo uloga amikacina u empirijskoj terapiji imipenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa*, što se može zaključiti i iz rezultata ove disertacije. Amikacin se često daje i u kombiniranoj terapiji infekcija uzrokovanih *Pseudomonas aeruginosa*. Radovi govore uglavnom u prilog sinergizma amikacina, kao i učinkovitosti kombinacijske terapije *in vivo* bez obzira na umjerenu osjetljivost na β-laktame *in vitro*.<sup>181,182</sup> S druge strane, ne može se sa sigurnošću tvrditi da kombinacijska terapija i s lijekovima aktivnim *in vitro* ima utjecaj na konačno preživljavanje bolesnika u *P. aeruginosa* bakterijemiji.<sup>183</sup> Na žalost nema prospektivnih studija koje bi

pokazale ili osporile učinkovitost kombinacijske nad monoterapijom u neutropeničnih bolesnika, ili bolesnika u JIL-u, odnosno onih s bakterijemijom, sepsom ili pneumonijom povezanom s mehaničkom ventilacijom.<sup>184</sup>

U studiji Higgins i sur. nije testiran kolistin, dok se u ovoj disertaciji kolistin pokazao kao vrlo potentan antibiotik. Učinkovitost kolistina ne iznenađuje, s obzirom na činjenicu da je većina izolata *Pseudomonas aeruginosa* u ovoj studiji bila multirezistentna, a kolistin pokazuje dobar učinak prema ovakvim izolatima.<sup>185</sup> Iako je kolistin antibiotik star oko 50 godina, sve opsežnija istraživanja farmakokinetike i farmakodinamike, omogućila su optimizirano korištenje ovog antibiotika, s maksimalnim pojačanjem antibakterijske aktivnosti, a smanjenjem toksičnosti i mogućnosti razvoja rezistencije.<sup>186</sup> Otprilike jednak postotak osjetljivih izolata zabilježen je u mikrodilucijskoj metodi za ceftazidim (30,8%) i piperacilin s tazobaktamom (28,4%). U studiji Higgins i sur. 40,7% imipenem-rezistentnih izolata bilo je osjetljivo na ceftazidim. Ova učinkovitost ceftazidima dijelom je razumljiva budući da osim metalo- $\beta$ -laktamaza (i dijelom dereprimirane AmpC  $\beta$ -laktamaze), ostalim  $\beta$ -laktamazama, cefalosporini III. generacije i karbapenemi nisu zajednički supstrat.<sup>52</sup> Izuzetak je membranska crpka MexAB-OprM koja u stanju hiperaktivacije može iz stanice eksportirati sve  $\beta$ -laktame, uključujući meropenem, ali se rezistencija i na imipenem obično javlja u kombinaciji s gubitkom proteina vanjske membrane OprD.<sup>187</sup> Što se cefepima tiče, i u ovoj se disertaciji potvrdila činjenica da cefepim, iako pripada četvrtoj generaciji cefalosporina nešto slabije djeluje in vitro na pseudomonasa od ceftazidima.<sup>188</sup> Za napomenuti je svakako da je cefepim upravo supstrat MexXY-OprM efluksnog sustava, a ne ceftazidim što može biti razlogom slabije djelotvornosti u odnosu na ceftazidim, posebice ako se ovakvi sojevi klonski prošire.<sup>189</sup> U studiji Cerbara i sur.<sup>190</sup>, koja je analizirala osjetljivost 160 imipenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa*, cefepim se pokazao



potentnijim od ceftazidima, dok je u studiji Voutsinas i sur.<sup>191</sup> bio komparativno jednak cefepimu (cefepim 74% osjetljivih, ceftazidim 77% osjetljivih). Ipak je za naglasiti veći sveukupni mortalitet koji se pripisuje terapiji cefepimom u odnosu na ostale  $\beta$ -laktame (odnos rizika-1,26).<sup>192</sup> Postotak ciprofloksacin osjetljivih izolata među karbapenem-rezistentnim izolatima *P. aeruginosa* vrlo je sličan postotku u studiji Higgins i sur. U toj je studiji 31,4% imipenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa* bilo osjetljivo na ciprofloksacin, a u ovoj disertaciji 26,8%, pri čemu je  $MIK_{90}$  bio 32  $\mu\text{g/ml}$ . Križna rezistencija na fluorirane kinolone i meropenem može biti posljedica pojačanog rada efluksnih crpki MexAB-OprM, MexCD-OprJ i MexXY-OprN.<sup>187</sup> Ipak, za rezistenciju i na imipenem potreban je dodatan mehanizam, poput smanjenja propusnosti vanjske membrane.<sup>25</sup> Iako ima izvješća o uspješnoj primjeni ciprofloksacina u monoterapiji multiplerezistentnih izolata *P. aeruginosa*, većina je studija potvrdila učinkovitost kombinacije ciprofloksacina s  $\beta$ -laktamskim antibiotikom, ako je izolat bio osjetljiv na taj  $\beta$ -laktam.<sup>193-195</sup> U studiji Landman i sur.<sup>196</sup> testirano je 196 imipenem-rezistentnih izolata među kojima je osjetljivost na amikacin, piperacilin-tazobaktam, ceftazidim, cefepim i ciprofloksacin bila 87%, 61%, 60%, 42% i 28%, dakle najučinkovitiji je bio amikacin te podjednako učinkoviti piperacilin-tazobaktam i ceftazidim te ciprofloksacin, slično rezultatima u ovoj disertaciji, iako su postotci osjetljivosti u studiji Landama i sur. viši.

Prilikom testiranja osjetljivosti izolata *P. aeruginosa* uočena je razlika u podudarnosti rezultata metoda koje su korištene, odnosno disk difuzijske, mikrodilucijske metode u bujonu i E-testa. Statistički značajna razlika u podudarnosti rezultata disk difuzijske metode i mikrodilucijske metode u bujonu u ovom je istraživanju zabilježena za cefepim, cefoperazon, aztreonam, imipenem, amikacin, ciprofloksacin i kolistin pri čemu je u pravilu statistički značajna nepodudarnost proizlazila iz velikog broja tzv. minor pogrešaka (proglašavanja umjereno

osjetljivog soja otpornim ili osjetljivim i obrnuto). Najveći postotak vrlo velikih grešaka, odnosno učestalo proglašavanje otpornog soja osjetljivim u disk difuzijskoj metodi zabilježeno je ponajviše za cefalosporine - ceftazidim, cefoperazon i cefepim te za kolistin dok su se izolati testirani na aztreonam i amikacin u disk difuzijskoj metodi češće proglašavali otpornima nego što se to pokazalo u mikrodilucijskoj metodi. Slične rezultate neprihvatljivo učestalih (>10%) malih grešaka zabilježeno je i u studiji u kojoj se testirala mikrodilucijska metoda u usporedbi s automatiziranim sustavima testiranja osjetljivosti upravo za ceftazidim, cefepim, imipenem i aztreonam dok se nekoliko puta veća učestalost od prihvatljive ( $\leq 1,5\%$ ) za vrlo velike pogreške uočila za piperacilin-tazobaktam i imipenem.<sup>197</sup> I studija u kojoj su analizirani samo automatizirani sustavi određivanja antimikrobne osjetljivosti (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek i Vitek 2) također je pokazala da ovi sustavi, kada je u pitanju *P. aeruginosa*, ne daju potpuno pouzdane podatke te da laboratoriji moraju pribjegavati dodatnim rješenjima.<sup>198</sup> Primjerice prevalencija vrlo velikih grešaka za imipenem bila je korištenjem VITEK 2 sustava oko 8%. U studiji provedenoj 1999. godine u UK, ispitana je točnost disk difuzijske metode za antipseudomonasne antibiotike (metoda je uspoređena sa standardom, odnosno mikrodilucijskom metodom u bujonu). Iako su rezultati bili bolji od onih zabilježenih 1993. godine, najlošiji rezultati bili su za meropenem, gdje je čak 49% izolata proglašeno otpornima, a pokazalo se retestiranjem u mikrodilucijskoj metodi osjetljivima (major greška). Slično je bilo za ceftazidim (34%), gentamicin (25%) i ciprofloksacin (7%).<sup>199</sup> U studiji Livermore i Chen-a iz 1999. godine<sup>200</sup>, problem u podudarnosti kategorija nije postojao za osjetljive izolate. Međutim, posebice kada su u pitanju bili  $\beta$ -laktami i amikacin, izolati s visokim MIK-ovima jednakom su učestalošću proglašavani i osjetljivima i rezistentnima. Autori zaključuju da je određeni postotak neslaganja neizbježan, ali da je neprihvatljivo velik

broj rezistentnih izolata proglašen osjetljivim te naglašavaju potrebu bolje standardizacije rutinskih metoda testiranja osjetljivosti.<sup>200</sup> Dakle, u rutinskom laboratorijskom radu moramo biti svjesni činjenice da ni disk difuzijska metoda ni automatizirani sustavi određivanja osjetljivosti nisu potpuno pouzdani kada je u pitanju *P. aeruginosa* i da će vjerojatno još biti rasprave o načinima pouzdanog testiranja posebice  $\beta$ -laktamskih antibiotika ovog vrlo čestog hospitalnog patogena. Što se kolistina tiče, ono što je neophodno naglasiti je da disk difuzijska metoda u agaru nije primjerena budući da su polipeptidi velike molekule koje slabo difundiraju u agar, rezultirajući relativno malom zonom inhibicije. Posljedica je slaba kategorijska diferencijacija osjetljivih i rezistentnih sojeva. Drugo što je važno je da se za laboratorijsko testiranje kolistina ne koristi kolistin metanesulfonat-kolistimetat, odnosno pripravak za intravensku uporabu već kolistin sulfat (koji rade kemijske tvrtke poput Sigma i sl.). Naime, kolistimetat će u prekonoćnoj inkubaciji hidrolizirati u niz intermedijata pri čemu će se karakteristike suspenzije s antibiotikom mijenjati što može utjecati na konačni rezultat. U svakom slučaju preporuka koje bi se trebalo držati je da se za izolate sa zonom inhibicije od 12-13 mm odredi MIK E-testom ili dilucijom u bujonu.<sup>201-203</sup> Unatoč prijedlogu za modificirane kriterije za disk difuzijsku metodu, odnosno da se umjesto promjera zone inhibicije  $>11$  mm za interpretaciju soja osjetljivim, postavi promjer  $>14$  mm, te MIK umjesto dosadašnjih  $\leq 2$  -  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ , postotak lažno osjetljivih sojeva odnosno very major grešaka i dalje je prema Gales i sur. oko 5% te je preporuka da klinički laboratoriji moraju koristiti isključivo MIK u slučaju terapijske aplikacije kolistina ili polimiksina B dok se ne publiciraju modifikacije interpretativnih kriterija od strane CLSI-a (op. aut. – EUCAST 2010 trenutno modificira kriterije za kolistin).<sup>204</sup>

Većina izoliranih pseudomonasa, njih 84 (gotovo 50%), bila je otporna na predstavnike iz svih skupina antipseudomonasnih antibiotika - ureidopenicilina, cefalosporina, karbapenema, aminoglikozida i fluorokinolona, odnosno imala je multiplerezistentni fenotip. U slučaju da se multipla rezistencija definira po literaturnim podacima kao rezistencija na predstavnike iz najmanje tri od pet skupina antipseudomonasnih antibiotika (ureidopenicilina, cefalosporina, karbapenema, aminoglikozida i fluorokinolona), takvih bi izolata bilo 138, odnosno 82%.<sup>25,196,205</sup> Učestalost multiplerezistentnih izolata *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) varira od zemlje do zemlje, ali i od institucije do institucije. Velike studije poput SENTRY (razdoblje od 1997.-1999.) bilježe učestalost MDRPA izolata u Europi od 4,7%, Latinskoj Americi 8,2%, SAD-u 1,2%.<sup>196</sup> U pojedinim institucijama učestalost je još viša pa tako Grčka<sup>206</sup> primjerice, navodi učestalost od 24,3%, Francuska<sup>207</sup> 24%, Italija 17%<sup>208</sup> te Kina<sup>209</sup> 24%. Većina sojeva rezistotipa I, kako su nazvani izolati rezistentni na barem jednog predstavnika svih pet skupina antipseudomonasnih antibiotika, pripadala je serotipu O12, njih 64 (42,4% svih tipiziranih sojeva, odnosno 64,6% svih O12 izolata). Drugi po učestalosti među serotipovima, serotip O11, također su pretežito sačinjavali sojevi rezistotipa I (16 od 29; 55,2%), iako su gotovo podjednako bili zastupljeni i drugi rezistotipovi. Ovi se serotipovi i u literaturi najčešće povezuju s multiplom rezistencijom na antibiotike, a postoje i pretpostavke da europski multirezistentni O12 izolati *P. aeruginosa* imaju zajedničko porijeklo.<sup>170,210</sup> Učestalost MBL pozitivnih izolata bila je u ovom istraživanju relativno mala, odnosno od ukupno 169 imipenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa* njih 6 (3,6%) bilo je MBL pozitivno. U velikim studijama koje su obuhvatile reprezentativan broj izolata, poput studije Rossolinija i sur. koja je obuhvatila oko 14.000 izolata, među kojima 2.500 onih nefermentativnih bakterija iz 12 talijanskih gradova s 222 izolata *P. aeruginosa*, prevalencija metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih

sojeva bila je 1,3%, uz dominaciju *P. aeruginosa* koji je sačinjavao 28 od ukupno 30 MBL pozitivnih izolata<sup>211</sup>, poprilično slično prevalenciji u Grčkoj<sup>212</sup> od 0,8% te nešto više od one od 0,1% u Španjolskoj,<sup>213</sup> ali poput one iz Japana<sup>214</sup> od 1,3%. U nekim područjima epidemiološki značaj izolata koji stvaraju metalo- $\beta$ -laktamaze poprilično je velik - npr. u studiji koja je analizirala nešto više od 500 imipenem rezistentnih izolata u Kanadi<sup>215</sup>, čak je 30% izolata imalo MBL ili 89% od pedesetak imipenem-rezistentnih izolata u Grčkoj.<sup>216</sup>

MBL pozitivni izolati ponajprije su detektirani fenotipski, dakle određivanjem redukcije minimalne inhibicijske koncentracije za imipenem u prisustvu 0,04 mM EDTA i 0,4 mM 1,10 fenantrolina, kelatora cinkovih iona, metodom mikrodilucije u bujonu (EPI) i E-testom. Ovo su relativno jednostavne metode koje se mogu primijeniti u rutinskom laboratorijskom radu. Ako se npr. za redukciju minimalne inhibicijske koncentracije uzme minimalna vrijednost od 4 puta kao pozitivna, EPI će u pravilu imati 100% osjetljivost, te nešto slabiju specifičnost - biti će naime oko 3% lažno negativnih rezultata.<sup>130</sup> Ovom metodom samo je šest izolata u disertaciji okarakterizirano kao pozitivno pri čemu se smanjenje MIK-ova na imipenem u prisustvu inhibitora metalo- $\beta$ -laktamaza kretalo od 16 do >32 puta. Bili su to izolati: rednog broja 3 iz brisa rane bolesnika s Kirurške klinike iz 2001. godine, izolat rednog broja 4 iz urina bolesnika s Odjela neurokirurgije iz 2001. godine, izolati rednog broja 5 i 6 iz krvi, odnosno aspirata traheje dvojice bolesnika iz JIL-a lokacije Križine iz 2002. godine, izolat rednog broja 43 iz urina bolesnika iz kirurškog JIL-a lokacije Firule iz 2004. godine te izolat rednog broja 178 iz brisa rane bolesnika s Interne klinike iz 2007. godine. Što se fenotipske detekcije ostalih  $\beta$ -laktamaza tiče, ono što je zabilježeno u najvećem broju izolata, bilo je smanjenje minimalne inhibicijske koncentracije za prosječno 4 puta za ceftazidim i imipenem u prisustvu fenilboronične kiseline, što smo dokazali u 104 od ukupno 169 testiranih izolata (59,7% od

ukupnog broja). Isti fenomen bio je vidljiv i u metodi dvostrukog diska pri čemu se značajnom razlikom smatralo povećanje zone inhibicije u prisustvu fenilboronične kiseline za više od 5 mm.<sup>133</sup> Fenilboronična kiselina je dobar inhibitor AmpC  $\beta$ -laktamaze koja je intrinzički prisutna u izolata *P. aeruginosa* i koja u stanju pojačane ekspresije ili derepresije, posredovane mutacijom regulatornih gena dovodi do rezistencije na cefalosporine treće generacije, ponekad i cefepim, pri čemu su karbapenemi u pravilu pošteđeni.<sup>151</sup> U ovoj disertaciji, međutim, fenilboronična kiselina smanjila je medijan MIK-ova za ceftazidim za 4 puta, a isto se potvrdilo i s imipenemom pa se čini da je rezistencija na imipenem dijelom rezultat aktivnosti upravo ove cefalosporinaze. U studiji Rodriguez i suradnika<sup>97</sup>, od 32 izolata *P. aeruginosa* koji su bili ili intermedijarno osjetljivi ili rezistentni na ceftazidim i imipenem, 29 ih je pokazivalo hiperekspresiju AmpC. U analizi aminokiselinskog sastava njihovog AmpC enzima opisano je čak 10 različitih varijanti. No, u izolatima u kojima je pronađena mutacija koja je rezultirala aminokiselinom alaninom na položaju 105 enzima, izolati su bili rezistentni na ceftazidim, cefepim i imipenem, što je ukazivalo na moguće novi mehanizam za imipenemsku rezistenciju. U studiji Juan i sur.<sup>217</sup> inaktivacija *ampD* gena koji kodira amidazu koja hidrolizira murapeptide i supresorski djeluje na AmpC bila je najčešći razlog pojačane aktivnosti AmpC, vjerojatno i uz promjene *ampE* gena koji s *ampD* čini *ampDE* operon koji kodira citoplazmatsku senzornu molekulu, te drugih još nepoznatih gena koji sudjeluju u regulaciji produkcije AmpC. Boronična kiselina djeluje stvarajući kovalentnu vezu sa serinskim reziduama u  $\beta$ -laktamazama i bolji je inhibitor AmpC  $\beta$ -laktamaza od kloksacilina za *P. aeruginosa*.<sup>218,219</sup>

Klavulanska kiselina, inhibitor serinskih  $\beta$ -laktamaza iz klase A po Ambleru, nije dovela do smanjenja MIK-ova na ceftazidim - naprotiv, medijan MIK-ova za ceftazidim bio je dva puta veći u prisustvu klavulanske kiseline, što je posljedica očekivane indukcije cefalosporinaze od

strane klavulanata.<sup>220</sup> Ni u metodi sinergije dva diska, koristeći disk amoksicilina s klavulanskom kiselinom te diskove cefepima, ceftazidima i aztreonama na udaljenosti od 2 cm od središta diska s klavulanskom kiselinom, nismo dokazali moguće prisustvo  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (ESBL) koje bi bile inhibirane klavulanskom kiselinom. S obzirom na moguću indukciju AmpC cefalosporinaze koja bi prikrila detekciju ESBL, isto smo pokušali uz nakapavanje fenilboronične kiseline na diskove, ali bez učinka. Iako smo zbog blizine Italije, u kojoj je u izolatima *P. aeruginosa* ponavljano opisan enzim PER-1,<sup>128,137,221</sup> očekivali prisustvo ove  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra, nismo uspjeli istu dokazati ni fenotipski ni molekularno. Postoji mogućnost da su izolati *P. aeruginosa* posjedovali druge tipove ESBL, poput spomenutih TEM (4, 21, 24, 42) ili SHV (2a, 5, 12), kao i ESBL varijante oksacilinaza poput derivata OXA-10, ali bi molekularna detekcija ovih oksacilinaza prelazila okvire ove radnje. Također je moguće da se potvrdila činjenica da se enzimi iz ove klase opisuju u *P. aeruginosa* relativno rijetko i to u ograničenim geografskim područjima te da pojedine  $\beta$ -laktamaze zapravo imaju svoja ekološka okruženja.<sup>222</sup> Ovaj zaključak podupiru rezultati studije u Turskoj u kojoj je čak 11% izolata *P. aeruginosa* posjedovalo PER-1 dok je učestalost među acinetobakterima bila još viša.<sup>223</sup>

Budući da nismo bili u mogućnosti zbog tehničkih razloga izvesti izoelektrično fokusiranje, za predmnijevajući mehanizam rezistencije na  $\beta$ -laktame, osim kromosomske cefalosporinaze, usporedili smo minimalne inhibicijske koncentracije na karbencilin, cefotaksim, ceftazidim i piperacilin. Naime s obzirom da je karbencilin reporter lijek za pojačanu ekspresiju MexAB-OprM crpke, u pravilu je kod ovakvih izolata (što se često smatra i intrinzičkom rezistencijom) MIK karbencilina > MIK-a cefotaksima > MIK-a ceftazidima > MIK-a piperacilina. U slučaju da je MIK cefotaksima veći od MIK-a karbencilina, koji može biti osjetljiv, obično je u pitanju

derepresija sinteze kromosomske AmpC  $\beta$ -laktamaze.<sup>224</sup> Izolirana rezistencija na karbenicilin može biti posljedica i aktivnosti PSE- $\beta$ -laktamaze, međutim u tom su slučaju cefemi djelotvorni. Ukupno 143 izolata pokazivalo je izrazitu rezistenciju na karbenicilin, koja je bila povezana s rezistencijom na cefotaksim i najčešće ceftazidim. Od tih 143 izolata, njih 91 (63,6%) pokazivalo je značajno smanjenje MIK-ova na ceftazidim u prisustvu fenilboronične kiseline. Od 26 izolata koji po odnosu minimalnih inhibicijskih koncentracija nisu pripadali skupini s vjerojatnim pojačanim radom efluksnih crpki, sedam je imalo značajnu inhibiciju s fenilboroničnom kiselinom. U pseudomonasa je opisano 12 efluksnih tripartitnih crpki iz porodice RND ("resistance nodulation division"), među kojima MexAB-OprM i MexXY-OprM najviše pridonose intrinzičkoj, uz još dvije MexCD-OprJ i MexEF-OprN koje pridonose stečenoj rezistenciji pseudomonsa kao posljedica mutacijske hiperekspresije efluksnih gena.<sup>225</sup> Osim antibiotika, ove crpke ekportiraju brojne boje, detergente, dezinficijense te laktone vezane za "quorum sensing", odnosno međusobnu komunikaciju bakterijskih stanica.<sup>34</sup> Pojačana ekspresija membranskih crpki javlja se kao posljedica izlaganja antibioticima - bilo *in vivo* ili *in vitro* i to najčešće zbog mutacija koje zahvaćaju regulatorne proteine.<sup>226</sup> Osim  $\beta$ -laktama fluorokinoloni su vrlo često supstrat efluksnih crpki, poput MexAB-OprM. Tako je među 143 izolata za koje smo predmnijevali da imaju pojačan rad efluksnih crpki, njih 110 (76,9%) bilo rezistentno i na ciprofloksacin, a od njih 110, čak 108 bilo je otporno i na aminoglikozide. Gotovo sve opisane crpke u pseudomonasa koriste fluorokinolone kao supstrat, dok jedino crpka MexXY koja koristi oprM, i jedina ima za supstrat fluorirane kinolone i aminoglikozide, može biti inducirana aminoglikozidima i predstavlja primjer adaptivne aminoglikozidne rezistencije u *P. aeruginosa* - naime izloženost bilo kojem aminoglikozidu dovodi do pan-aminoglikozidne rezistencije sa smanjenjem nakupljanjem lijeka, koja se brzo gubi



prestankom izloženosti.<sup>227</sup> Može se dakle zaključiti da bi s obzirom na široku supstratni profil inhibitori ovih efluksnih crpki bile dobar terapijski izbor kako bi se smanjila intrinzička i stečena rezistencija u *P. aeruginosa*.<sup>228</sup> Isti inhibitori mogu se koristiti i u dijagnostičke crpke i svakako bi bili korisni da su upotrebljeni i u ovom radu, ali na žalost nisu bili raspoloživi. Svakako da treba uzeti u obzir činjenicu da se pouzdana analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju rada efluksnih crpki može provesti samo kvantitativnim PCR reakcijama, što također nije bilo tehnički izvedivo u ovoj disertaciji.<sup>229</sup> Naposljetku, SDS-PAGE elektroforeza proteina vanjske membrane pokazala je u samo 17 izolata (13,1%) postojanje proteina OprD. Većina ovih izolata, njih 15, pokazivala je značajan učinak fenilboronične kiseline na smanjenje MIK-a ceftazidima, odnosno hiperekspresiju AmpC, kao i odnose MIK-ova prema karbenicilinu, cefotaksimu i ceftazidimu koji su govorili i za pojačanu aktivnost efluksnih crpki. Preostala dva izolata bila su u skupini sojeva koji su imali samo hiperekspresiju AmpC kromosomske cefalosporinaze. Dakle, fenotipski detektirajući rezistenciju mogli smo sveukupno utvrditi da izolati rezistotipa I koji su po definiciji bili rezistentni na predstavnike svih pet skupina antipseudomonasnih antibiotika, imaju većinom izražena sva tri mehanizma rezistencije - hiperekspresiju ili derepresiju AmpC, pojačan rad efluksnih crpki i gubitak porina OprD. Izolati rezistotipa II - dakle izolati koji su bili osjetljivi samo na aminoglikozide većinom su imali mehanizme kao i prethodna skupina, slično kao i izolati rezistotipa III (osjetljivi samo na fluorokinolone) i IV (osjetljivi samo na ureidopeniciline). Za izolate rezistotipa III efluks se ne čini vjerojatno objašnjenje rezistencije pa je moguće da su u pitanju i drugi mehanizmi, vjerojatno prisustvo  $\beta$ -laktamaza. Izolati rezistotipa V (osjetljivi na cefalosporine) uglavnom su bili bez porina vanjske membrane uz pojačan rad efluksnih crpki. Rezistotip VIII, odnosno rezistencija na karbapeneme i fluorokinolone zabilježena je u 11 izolata s pojačanim efluksom i

bez OprD, slično kao i izolati rezistotipa IX (izolirana rezistencija na karbapeneme). Rezistotipovi VI i VII sporadično su se pojavljivali. Dakle ono što se može zaključiti je da u *P. aeruginosa* vrlo rijetko sudjeluje jedan mehanizam rezistencije već se najčešće radi o međuigri cefalosporinaze AmpC, induciranog efuksa i gubitka OprD.<sup>230</sup> Od ukupno 169 izolata, lančanom reakcijom polimeraze, amplificirala se ciljna DNK gena *OprD* u samo 93 (55%) soja. Od tih 93 izolata, njih 22 imalo je ekspresiju gena, odnosno prisustvo proteina OprD u vanjskoj membrani. Skupina od preostalih 71 izolata nije imala ekspresiju gena koji kodira OprD, dok se u 76 izolata nije mogao amplificirati gen, ni dokazati membranski protein. Možemo dakle zaključiti da je razlog nepostojanja proteina OprD na vanjskoj membrani pseudomonasa dijelom posljedica transkripcijskih, a dijelom translacijskih zbivanja. Na nivou samog gena, često se insercijskom sekvencijom inaktivira sam gen, ili se delecijama, odnosno tranzicijama baza stvaraju prematuri stop kodoni koji dovode do ranog prekida prepisivanja.<sup>231</sup> U tzv. *nfxC* mutanata može doći do represije transkripcije OprD uz pojačan rad efluksne crpke MexEF-OprN te križne rezistencije na fluorokinolone i karbapeneme, poput izolata rezistotipa VIII u ovoj disertaciji.<sup>225,232</sup> Gubitak porina vanjske membrane može se javiti vrlo rano tijekom karbapenemske terapije pa već nakon tjedan dana liječenja s karbapenemima 50% izolata gubi OprD.<sup>233</sup> I u slučaju proteina vanjske membrane kvantitativni PCR mogao bi pružiti pouzdane informacije o stupnju translacije gena. Tako se čini da izolati s MIK-ovima za imipenem većim od 32 µg/ml obično imaju vrlo malu količinu mRNA za OprD, oni s MIK-ovima od 8-12 µg/ml svega 0,1 do 0,6 od količine u PAO1 izolata, pa neki autori pribjegavaju objašnjenju gubitka oprD proteina putem tzv. "downregulacije", nego potpunog gubitka porina.<sup>234</sup> SDS-PAGE elektroforeza korištena u ovom radu mjeri sveukupnu količinu proteina i nije metoda izbora za detekciju smanjenih količina proteina nastalih zbog translacijskih poremećaja.<sup>234</sup>

Iako je gubitak proteina vanjske membrane prevladavao u analiziranih izolata *P. aeruginosa* studije ukazuju da sam gubitak porina vanjske membrane nije dovoljan za posljedičnu rezistenciju na karbapeneme te da mora biti još najmanje jedan dodatni mehanizam u igri, što se pokazalo i u ovom radu, budući da je većina izolata imala i hiperekspresiju kromosomske cefalosporinaze ili pojačani rad efluksnih crpki.<sup>235</sup>

Molekularnim metodama dokazali smo prisustvo VIM-2 metalo- $\beta$ -laktamaze u izolatima koji su pokazivali pozitivan EPI test, odnosno značajno smanjenje MIK-a za imipenem u prisustvu inhibitora metalo- $\beta$ -laktamaza - EDTA (i fenantrolina). VIM-2 metalo- $\beta$ -laktamaza izvorno je opisana u *P. aeruginosa* izolata iz uzorka krvi neutropeničnog bolesnika iz Marseilla.<sup>78</sup> Ovaj je enzim bio vrlo sličan ranije opisanom VIM-1, izoliranom iz Verone<sup>50</sup>, s 90% jednakim aminokiselinskim sastavom. Izvorno je gen *bla*<sub>VIM</sub> opisan kao dio jedine genske kazete na integronu In56, locirane na 45 kb plazmidu. U kasnijim radovima pseudomonasi s VIM-1 i VIM-2 karbapenemazama opisivani su kao uzročnici ozbiljnih nozokomijalnih epidemija u Italiji i Grčkoj.<sup>114,236,237</sup> Brojne europske zemlje opisuju upravo VIM-2 enzime u kliničkim izolatima *P. aeruginosa* poput Španjolske, Njemačke, Portugala, Poljske, Rusije, Irske, Mađarske, Turske, Švedske, Srbije i dr. ali i zemlje na ostala tri kontinenta - Venezuela, Japan, Koreja, Kina, Saudijska Arabija, Indija, USA i Kanada.<sup>61,79</sup> Možemo u stvari reći da je u *P. aeruginosa* VIM-2 danas najraširenija metalo- $\beta$ -laktamaza u svijetu. Od ukupno šest MBL pozitivnih izolata, u njih pet *P. aeruginosa* je imao serotip O11, dok je jedan izolat bio O12 serotipa, čime sumo potvrdili povezanost serotipova O12 i O11 s VIM  $\beta$ -laktamazom, što potvrđuju i izvješća o bolničkim epidemijama u Grčkoj, Italiji ili Koreji.<sup>236-239</sup> U Grčkoj je tako tri godine perzistirala bolnička epidemija s izolatom *P. aeruginosa* serotipa O12 koji je stvarao VIM  $\beta$ -laktamazu, pri čemu je izolirano više od 200 izolata s takvim rezistotipom.<sup>114</sup> Indeks

sojevi opisani 2003. godine (a izolirani 2000. godine) nisu aglutinirali ni s jednim komercijalnim antiserumom za *P. aeruginosa*.

Enzimatska aktivnost straničnih ekstrakata VIM-2 pozitivnih sojeva kretala se od 120 do >170 nmol/min/g proteina što je slično aktivnosti zabilježenoj u ostalim europskim izolatima VIM-pozitivnih *P. aeruginosa*.<sup>132</sup> MBL pozitivni izolati samo su dijelom pripadali istom klonu - po genotipizaciji PFGE metodom uz *Xba* restriksijsku endonukleazu izolati rednog broja 3, 4, 5 i 6 pripadali su istom klonu, dok izolati 43 i 178 nisu bili klonski srodni preostalima. Genotipovi MBL pozitivnih izolata uspoređeni PFGE metodom uz *Spe* restriksijsku endonukleazu te RAPD s početnicama 208 i 272 govorili su u prilog klonske srodnosti izolata 3, 4, 5, 6 i 178. Izolat 43 nije bio klonski srodan preostalima i bio je jedini serotipa O12, dok su ostali bili serotipa O11, kako je već spomenuto. U studiji Giske i sur.<sup>239</sup>, gdje je MLST metodom uspoređena klonska srodnost europskih VIM-pozitivnih izolata, autori ponovo potvrđuju hipotezu kako upravo serotipovi O11 i O12 igraju ulogu u pojavi i diseminaciji VIM gena te da VIM pozitivni europski izolati moguće potječu od jednog ancestralnog klona koji je potekao iz mediteranskih zemalja. Što se tiče osjetljivosti na antibiotike, izolati rednog broja 3, 4, 5, i 6 pripadali su rezistotipu IV, odnosno bili su osjetljivi na ureidopeniciline (te aztreonam i kolistin), izolat rednog broja 43 bio je osjetljiv na piperacilin s tazobaktamom (i azteonam i kolistin), a izolat rednog broja 178 samo na aztreonam. Iako se u pravilu svi β-laktami s izuzetkom aztreonama navode kao supstrati metalo-β-laktamaze, ni po literaturnim podacima to nije uvijek slučaj, bilo da se radi o IMP-<sup>240</sup> ili VIM- karbapenemazi<sup>132,209,240</sup>. Ono što je zanimljivo, jest činjenica da se upravo piperacilin sam ili u kombinaciji s tazobaktamom pojavljuje, poslije aztreonama kao lijek koji je najmanje zahvaćen hidrolitičkom aktivnošću ovog enzima. Svakako je za napomenuti i da su minimalne inhibicijske koncentracije za

ureidopeniciline bile u svih metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih sojeva veće od 16  $\mu\text{g/ml}$ , što prema interpretaciji EUCAST-a odgovara kategoriji rezistentno (EUCAST: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.0 December 2009; dostupno na [www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

Većina izolata *P. aeruginosa* analiziranih u ovoj disertaciji pripadala je dvama klonskim skupinama - predominantnoj A u koji je uz prijelomnu točku od >80% genetske sličnosti pripadalo 77 izolata (45%) izoliranih u petogodišnjem razdoblju od 2003. do 2007. godine. Druga klonska skupina, koju je sačinjavao 61 izolat (35,7%), perzistirala je u šestogodišnjem razdoblju od 2001. do 2007. godine i unutar ove skupine nalazio se najveći broj metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih izolata. Dakle oko 80% izolata pripadalo je dvjema dominantnim klonskim tipovima. Istovremeno, najveći broj izolata klonskog tipa A imao je serotip O12 (69 od ukupno 77; 89,6%) i rezistotip 1 (66,2%), a više od trećine izolata klonskog tipa B imala je serotip O11 (24 od 61; 39,3%) te rezistotip IV ili V (32,7%). Dakle, rezultati genotipizacije i serotipizacije ne koreliraju u potpunosti pa izolati iste genetske strukture mogu imati različiti serotip i naravno, obrnuto, što je bilo i za očekivati. Stoga se može zaključiti da iako serotipizacija predstavlja, nakon antibiograma, prvu liniju tipizacije kliničkih izolata nije potpuno pouzdan epidemiološki pokazatelj.<sup>174</sup> Rezultati ovog rada ukazuju i na istovremenu ekspanziju multirezistentnog klona O12 koji je u radu naših autora iz 2001. godine bio izrazito rijedak (<4% analiziranih izolata), ali su u skladu sa sveopćim trendom u Europi.<sup>170</sup> U svakoj od osnovnih klonskih skupina imamo nekoliko klonskih podtipova, a ono što je posebice zanimljivo je da unutar jednog klonskog podtipa, nalazimo genetski potpuno jednake jedinice, od kojih primjerice jedna ima gen za metalo- $\beta$ -laktamazu, a druga nema, što se u literaturi često spominje.<sup>241</sup> To nas upućuje na zaključak da sojevi stječu VIM determinante vjerojatno iz

endemski prisutnih drugih sojeva, i ponekad imaju potencijal za klonsku ekspanziju, što čini se nije slučaj u našem ekološkom okruženju. Dakle, može se zaključiti da genotipizacija karbapenem-rezistentnih izolata *P. aeruginosa* ukazuje i u ovom radu na prisustvo jedinstvenih genetskih jedinki izmiješanih s nekoliko značajnih klonskih kompleksa. Izolati unutar istog klona u različitim kliničkim odjelima upućuju na prijenos istog soja među bolesnicima, ili neovisno stjecanje istog soja iz različitih izvora. Najveća skupina genetski potpuno jednakih izolata (koeficijent sličnosti 100%) koju u dendrogramu sačinjavaju izolati od rednog broja 10 - 148, bila je primjerice prisutna od 2003. do 2006. godine, sojevi su bili prisutni u sekretima donjih dišnih putova, urinu, sadržaju prsišta, svi su bili serotipa O12, a bolesnici su se nalazili na dvije različite lokacije bolnice. Dugo zadržavanje klonski srodnih izolata pa i nekoliko godina u bolničkom okruženju većinom je karakteristika upravo multirezistentnih izolata. U studiji Tsukayama i suradnika ribotipovi *P. aeruginosa* s ispoljenom fenotipskom rezistencijom dulje su preživljavali u bolničkoj sredini, bez obzira na rotaciju antibiotika pa se čini da kod pseudomonosa rotacija antibiotika kao dio strategije za smanjenje učestalosti multirezistentnih izolata baš i nema smisla.<sup>242</sup> Međutim, studije često ukazuju na genetsku nesrodnost imipenem-rezistentnih izolata pseudomonasa što ukazuje na ponavljanu selekciju rezistencije. Tako je u studiji Jamasbi i suradnika<sup>174</sup> više od 80% izolata rezistentih *P. aeruginosa* bilo genetski različito. Čini se da je *P. aeruginosa* često neklonalan s epidemijском populacijskom strukturom te mogućnošću horizontalnog prijenosa, prerespodjele i rekombinacije. Pirnay i suradnici<sup>243</sup> zaključuju da se pseudomonas najčešće ponaša sa superficijalnom klonskom strukturom koja je podložna čestim rekombinacijama među kojima ponekad izađe vrlo uspješan epidemijски klon. Metalo-β-laktamaza pozitivni izolati imali su relativno različitu gensku strukturu budući da su izolati rednog broja 3, 4, 5, 6 te vjerojatno 178

pripadali jednom klonu, a izolat 43 drugom, ali im je svima integron koji je sadržavao gensku kazetu s *bla<sub>VIM</sub>* genom bio lociran na kromosomu, i bio potpuno jednak, što dodatno ukazuje na horizontalan prijenos genetskog materijala i među genetski različitim jedinkama. Iako se genske kazete mogu slobodno kretati iz jednog integrona u drugi, za prijenos cijelog integrona potrebna je pomoć drugih genetskih elemenata poput plazmida i transposona.<sup>98</sup> Većina opisanih MBL gena nalazi se na plazmidima veličine od 120 do 180 kb.<sup>82</sup> U izolata u kojih nije dokazano prisustvo plazmida, MBL geni i njihovi integroni uglavnom su, poput izolata iz Italije i Poljske, unutar Tn5051-tipa transposona koji je odgovoran za diseminaciju ovih gena među genetički različitim jedinkama.<sup>61</sup> Pretpostavljamo da je u MBL pozitivnim izolatima iz ove disertacije došlo do prijenosa integrona putem transposona s obzirom da plazmidi unutar ovih izolata nisu dokazani. Jedinstveni genetski kontekst MBL opisan je kao dio mobilnog otoka patogenosti ("mobile pathogenicity island") lociranog na 180 kb plazmidu u brazilskim izolatima *P. aeruginosa* sa SPM-1 metalo- $\beta$ -laktamazom.<sup>92</sup>

Osnovna struktura integrona koji je bio prisutan u svim izoliranim MBL pozitivnim sojevima *P. aeruginosa* tipična je za klinički integron klase 1. Na 5' i 3' kraju ima konstantna obilježja, dok je zanimljivost u varijabilnoj regiji koja se još naziva i područjem genskih kazeta unutar kojeg je genetički materijal poredan u istoj orijentaciji. Konzervirana regija 5' kraja koja se još naziva i 5'-konzervirani segment ima uobičajena četiri obilježja integrona. To su: terminalna obrnuto ponavljajuća regija ("terminal inverted repeat") od 25-bp koja je važna prilikom blok transpozicije integrona, gen integraza (*intI*) koji kodira *IntI* integrazu, odnosno mjesto-specifičnu rekombinazu, *attI* - ciljno mjesto za integraciju nove genske kazete i promotor o kojem ovisi ekspresija genskih kazeta nizvodno, a koji se nalazi unutar *intI* gena. Redoslijed baza u ovom dijelu integrona vrlo je konzerviran, odnosno postoje vrlo male razlike unutar

klase 1 integrona pa se čini da su integroni klase 1 potekli od zajedničkog pretka te da je taj događaj relativno recentan.<sup>245</sup> Integroni koji se nalaze u ljudskim patogenima i komenzalima nazivaju se i klinički integroni, a vrlo slični nađeni su u okolišnim bakterijama reda *Betaproteobacteria*. Iako ovi integroni ne sadržavaju gene za rezistenciju na antibiotike čini se da predstavljaju veliki rezervoar integrona koji su endemični u okolišu koji nas okružuje. Po prirodi gena *intI* definirana je klasa integrona. Iako je do danas definirano četiri klase integrona, geni za metalo- $\beta$ -laktamaze najčešće se nalaze u integronima klase I, kao što je to i slučaj s izolatima analiziranim u ovom radu.

Unutar *intI* gena nalazi se glavni promotor  $P_c$  koji poredoslijedu baza u ovom integronu odgovara slabom promotoru i čija je transkripcijska aktivnost slaba, a nizvodno od njega nalazi se drugi promotor  $P_2$  unutar kojeg je moguće da integracijom tripleta GGG u 14 bp "spacer" dođe do promjene broja baza između -35 i -10 heksamera promotora što bi dovelo do moguće boljeg prepisivanja prvog gena koji se nalazi nizvodno, odnosno VIM-2 gena. Promotori su u pseudomonasa vrlo aktivni, što objašnjava i visoke MIK-ove na imipenem, za razliku od slabe aktivnosti u enterobakterija. Prvu gensku kazetu - VIM-2 povezuje s 5' krajem integrona *attI* mjesto čiji redoslijed baza odgovara do sada opisanima. Rekombinacijsko mjesto posjeduje središnje mjesto koje se naziva jednostavnim mjestom te lijevo od toga nalaze se mjesta jakog i slabog vezivanja *IntI*. Gen za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaze VIM-2 nalazi se u InCRO integronu unutar DNK fragmenta koji se naziva genska kazeta - ona je omeđena sa strane 5' kraja *attI* mjestom te središnjim mjestom ("core site") 59-be elementa (*attC* mjesto) koji je sekundarno mjesto integrazom posredovane specifične rekombinacije.<sup>99,102,107</sup> Integraza koju kodira gen *IntI* posreduje rekombinaciju koja se događa između jednostavnog mjesta unutar *attI* gena i jedinstvenog mjesta unutar "core site" središnjeg mjesta (*attC*) koji slijedi konsensus

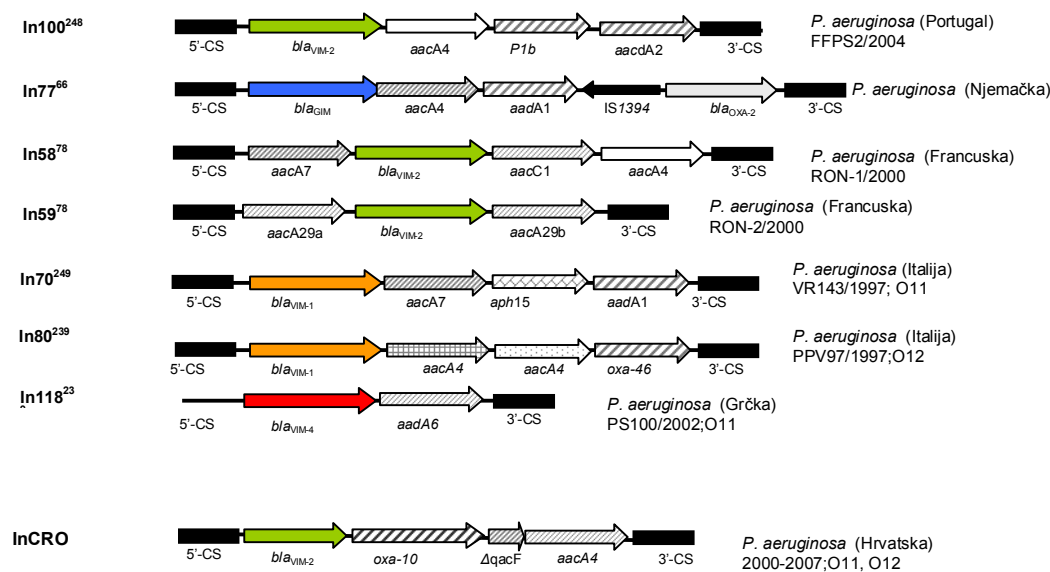


GTTRRRY (R-A ili G; Y- T ili C). Ostatak 59-be nakon integracije genske kazete ostaje na 3' kraju gena, a započinje savršenim palindromom "core site" mjesta zbog čega se naziva "inverse core site". Činjenica da je ova genska kazeta najbliža genu integraze znači da je posljednja stečena unutar integrona, ali da se i najučinkovitije prepisuje. Smatra se da je položaj genske kazete unutar integrona na 1. mjestu u stvari posljedica intenzivne uporabe karbapenema u posljednje vrijeme te se stoga smatra da su integroni koji unutar sebe imaju gen za proizvodnju metalo- $\beta$ -laktamaze na prvom mjestu recentan događaj.<sup>246</sup> Redoslijed nukleotida u VIM-2 genu u potpunosti odgovara opisanima u integronima In58 i In59 u Europi (Francuska)<sup>78</sup>, ali i primjerice integronu In76 iz Latinske Amerike.<sup>247</sup>

Ni jedan od opisanih integrona do sada nema ni sastav ni poredak genskih kazeta kao u integronu InCRO. Slika 34 prikazuje usporedbu integrona InCRO s nekima od integrona opisanima u Europi u čijem se sastavu nalazi genska kazeta s genom za produkciju VIM metalo- $\beta$ -laktamaze. Ono što se može uočiti na slici je da se uz gene za produkciju MBL najčešće unutar integrona nalaze geni za produkciju aminoglikozid-modificirajućih enzima, poput *aadA*, *aacC*, *aacA* i drugih. Druge  $\beta$ -laktamaze opisuje se sporadično - In100 ima PSE-1, dok In77 (uz GIM) ima OXA-2, a In80 (uz VIM-1) OXA-46. Ni jedan od najčešće opisivanih integrona nema unutar integrona kazetu *qacF*.

Nakon genske kazete s genom *bla<sub>VIM</sub>* slijedi genska kazeta koja sadržava gen za proizvodnju enzima OXA-10. Slijed nukleotidnih baza potpuno odgovara izvorno opisanom, inače se ova oksacilinaza pojavljuje još pod nazivom PSE-2.<sup>250</sup> Ovo je prva specifičnost novog integrona InCRO. Naime, vrlo se rijetko u istom integronu, jedna do druge, nalaze genske kazete s genima za produkciju dvije različite  $\beta$ -laktamaze. Prvo takvo izvješće pojavljuje se u opisu integrona *P. aeruginosa* In100, gdje se uz karbapenemazu VIM-2 pojavljuje genska kazeta s

genom PSE-1/CARB-2.<sup>248</sup> U izolatima *P. aeruginosa* koji su u integronu klase 1 posjedovali SPM metalo  $\beta$ -laktamazu, opisana je oksacilinaza OXA-56 kao sastavni dio integrona In163.<sup>251</sup> Posljednji opis sličnog integrona dolazi iz Japana, ali se radi o izolatu *P. putida* s VIM-6 MBL te OXA-10 enzimom.<sup>252</sup>



**Slika 34. Shematski prikaz integrona koji sadržavaju gene za produkciju metalo- $\beta$ -laktamaza VIM-tipa u izolata *P. aeruginosa* opisanih u nekim europskim zemljama u usporedbi s integronom InCRO.**

Smjer prepisivanja gena određen je smjerom strelica. Različitim bojama prikazane su varijante gena za produkciju VIM metalo- $\beta$ -laktamaze.

U ovom integronu obje su  $\beta$ -laktamaze kodirane genima genskih kazeta na rednom mjestu jedan i dva, kao i u InCRO integronu (vidi dalje). Integroni koji su opisani u VIM-4 pozitivnim izolatima iz Mađarske (imali su u svom sastavu OXA-2  $\beta$ -laktamazu na položaju 3 ili 4 u

odnosu na 5' CS segment).<sup>253</sup> Izolati su bili O12 i O11 serotipa pri čemu su oni O11 serotipa pokazivali veću klonsku srodnost od onih O12 serotipa. Ovo klonsko širenje O11 izolata imalo je Mađarskoj 2005. godine za posljedicu visoku učestalost MBL pozitivnih izolata od oko 6,5% među imipenem-rezistentnim *P. aeruginosa*.<sup>253</sup> PSE/OXA su najčešće stečene  $\beta$ -laktamaze u pseudomonasa.<sup>47</sup> Oksacilinaza OXA-10 koja se nalazi u sastavu InCRO integrona (često se naziva proširenog spektra) ne utječe bitno na minimalne inhibicijske koncentracija  $\beta$ -laktamskih antibiotika s izuzetkom karbenicilina i oksacilina. Može doći do umjerenog povećanja minimalne inhibicijske koncentracije na piperacilin koja se obično kreće oko 64  $\mu\text{g/ml}$  (po kriterijima CLSI-a odgovara interpretaciji osjetljiv) i cefoperazon.<sup>54</sup> Njezini derivati, međutim, poput enzima OXA-11, -13, -14, -15, -16, -17 i -19 pravi su predstavnici  $\beta$ -laktamaza iz molekularne klase D proširenog spektra djelovanja.<sup>41,46</sup> Ove mutante nastale točkastim mutacijama gena te promjenom odgovarajućih aminokiselina unutar enzima hidroliziraju učinkovito sve  $\beta$ -laktame izuzev karbapenema. ESBL varijante OXA-2 i OXA-10 enzima jedinstvene su u *P. aeruginosa* te se uglavnom opisuju u izolatima iz Turske i Francuske.<sup>151</sup> Za OXA-10 mutante je također karakteristično da sve, s izuzetkom OXA-18 imaju sadržaj G+C baza koji više odgovara onom u enterobakterija, što podupire hipotezu o mogućoj ekspresiji gena različitih bakterijskih vrsta putem integrona.<sup>254</sup> I u InCRO integronu oksacilinaza je povezana s genom za modifikaciju aminoglikozida; ova asocijacija iz do sada neobjašnjelog razloga vrlo je česta u integronima klase 1.<sup>255</sup> U integronu In77<sup>66</sup> iz Njemačke nalazi se OXA-2  $\beta$ -laktamaza (ali iza insercijske sekvence koja sprječava prepisivanje gena nizvodno), a u integronu In80<sup>239</sup> iz Italije OXA-46 koja je također  $\beta$ -laktamaza iz linije OXA-2 s kojom posjeduje oko 78% sličnosti i obje su uskog spektra djelovanja (penicilini, cefalosporini uskog spektra).

Iza genske kazete OXA nalazi se genska kazeta s parcijalnim genom *qacF* ("quarterny ammonium compounds"). Od oko 340 baza, koliko se nalazi u potpunom genu,<sup>256</sup> u ovom je integronu prisutna parcijalna varijanta unutar koje je tijekom prepisivanja došlo do delecije većeg dijela gena s ostatnih oko stotinu baza. Ova je genska kazeta nepokretna s obzirom da joj nedostaje potpuni 59 be, odnosno attC mjesto, nužno za rekombinaciju.<sup>257</sup> Vjerojatno je tijekom rekombinacije došlo do nepotpune insercije *qacF* gena, što nije neuobičajeno prilikom ekcizija i insercija genskih kazeta u integronima. Vjerojatnije je da se ovaj događaj zbio tijekom razmjene genetskog materijala među integronima nego tijekom transpozicije integrona.<sup>107</sup> Gen *qacF* pokazuje 75% sličnosti s genom *qacEdelta1*.<sup>256</sup> Gen *qacEdelta1* također je postdelecijska verzija gena *qacE* i redovito se nalazi na 3' kraju integrona i u mogućnosti je sintetizirati samo atenuirani eksporter.<sup>103</sup> Oba gena naime, kodiraju proteine koji pripadaju obitelji malih proteinskih eksportera sa samo 4 transmembranske domene koji su u mogućnosti aktivno eksportirati u zamjenu za protone niz boja (etidij bromid, kristal violet) i antiseptika (kvarterni amonijevi spojevi, bigvanidi, klorheksidin) pa dakle posreduju rezistenciju na te kemijske tvari.

Iza parcijalne genske kazete s genom *qacF* u integronu InCRO nalazi se genska kazeta s genom za acetilaciju aminoglikozida *aacA4*. Genske kazete koje sadržavaju gene za enzimatsku modifikaciju aminoglikozida zapravo su najčešće genske kazete unutar integrona što objašnjava fenotip rezistencije takvih kliničkih izolata koji osim  $\beta$ -laktama redovito uključuje i aminoglikozide.<sup>66,78,247,258</sup> Najčešći gen za modifikaciju aminoglikozida koji se nalazi u integronima je *aadA2* moguće zbog rane raspoloživosti streptomocina i selektivnog pritiska koji je uslijedio puno prije od onog  $\beta$ -laktama i ostalih aminoglikozida.<sup>259</sup> Gen *aacA4* kodira aminoglikozid modificirajući enzim 6'-N-acetiltransferazu koja uz pomoć koenzima A acetilira amino grupu aminoglikozida, a u *Pseudomonas aeruginosa* opisuje se kao najčešći

aminoglikozid-modificirajući enzim.<sup>260,261</sup> 6'-N-acetiltransferaza (aac6'-Ib) posreduje rezistenciju na sve aminoglikozide, odnosno tzv. aac6-I fenotip pri čemu modifikacija jedne aminokiseline (leucin-serin na 119 mjestu) mijenja i fenotip rezistencije,<sup>262</sup> uz mogućnost da sojevi budu osjetljivi samo na amikacin ili rezistentni na sve aminoglikozide kao što je to slučaj u opisanim izolatima u ovom radu. Na konačan fenotip rezistencije na aminoglikozide, posredovan modificirajućim enzimima mogu utjecati i više njih istovremeno, pa su u integronima vrlo često prisutna dva i više aminoglikozid modificirajuća enzima, a često nastaju i novi fuzirani geni s dva enzima, koji ukazuje na mogući potencijal koji rekombinacije genskih kazeta unutar integrona mogu predstavljati.<sup>263</sup> U opisanom integronu enzim aac6"-Ib" fuzirao se s enzimom aac(3)-Ib u jedinstvenu gensku kazetu čiji produkt fuziranog gena daje kombinirani fenotip rezistencije.

Konzervirani segment na 3' kraju sastoji se od ancestralne genske kazete - *qacEΔ1* koja se najčešće opisuje u ovom dijelu integrona.<sup>264,265</sup> QAC geni za rezistenciju pripadaju dvjema obiteljima; *qac A/B* geni nalaze se u stafilokokima na multirezistentnim plazmidima, *qacF*, *QacEdelta1* te *qacE* i *qacG* identificirani su u integronima i pripadaju obitelji malih multirezistentnih gena.<sup>266</sup> Biocidi su duže u upotrebi nego antibiotici, a *qac* ("quaternary ammonium compounds" - kvarterni amonijevi spojevi) geni, ili njihovi ostaci, su normalna osobina klasa 1 integrona iz kliničkih izolata.<sup>266</sup> Shodno tome, moguće je da su početne selektivne prednosti bile otpornost na biocide, posredovane *qac*-genom. *Qac* genske kasete su dominantna značajka kazeta okolišnih klasa 1 integrona, a ne kliničkih, gdje se pojavljuje neovisno o kasetama s genima koji posreduju rezistenciju na antibiotike. Oni su prisutni i njihovo obilje čini ih vjerojatno kandidatima za sudjelovanje u originalno umetanje u Tn402.<sup>266,267</sup> Štoviše, povećavajući uporabu kvarternih amonijevih spojeva i drugih biocida u

sadašnjem trenutku izgleda da se potiče fiksacija novih genskih elemenata, s nepredvidljivim posljedicama za ljudsko zdravlje i poljoprivredu.<sup>245</sup>

Konzervirani segment na 3' kraju ima jedan je od tri poznata oblika kostura - prvi koji se sastoji od Tn402 (In16)-sličnog modula s tri transpozicijska gena i genom resolvaze; drugi tzv. In5 koji ima *qacEΔ1*, *sull*, *orf5*, *orf6* i parcijalni *tni* modul, *tniΔ*, s dva transpozicijska gena te treći In4 koji ima samo *qacEΔ1*, *sull*, *orf5* i *orf6*.<sup>264,265</sup> *Tni* moduli omogućuju samo-transpoziciju, iako vjerojatno i In4 te In5 mogu biti pokretni. 3' konzervirani segment s parcijalnim *qacE* genom koji se naziva *qacEΔ1* u ovom radu pripada kosturima In4 ili In5 s obzirom da se nije radio PCR ciljano za potpuno sekvencu 3' kraja. I gen *qacEΔ1* zapravo je doživio deleciju od izvornog gena *qacE* i upravo se kao takav najčešće pojavljuje unutar 3' konzerviranog kraja integrona; delecija je dijelom uzrokovana insercijom segmenta *sull* i ORF5. Ovaj gen kodira protein koji je manje funkcionalan od izvornoga, ali se među Gram-negativnim bakterijama pojavljuje češće od gena *qacE*.<sup>268</sup> Sekvenciranje DNK, filogenetske studije i mapiranje sugeriraju da je klasa 1 integrona nastala kada je jedan član iz okolišnih integrona postao ugrađen u Tn402 transposon. Međutim, vrijeme ovog događaja i selektivne snage koje su fiksirale ovaj element u bakterijske linije još je uvijek nepoznato.<sup>245</sup> S obzirom da se u kontekstu genske sličnosti genskih kazeta s do sada opisanima, uvijek uspoređuje i njihov 59-be, odnosno *attC* mjesto, analizirana su *attC* mjesta svih genskih kazeta. Prilikom insercije genske kazete koja iz cirkularnog oblika prelazi u integrirani linearni oblik, *attC* mjesto zauzima položaj ispred i iza gena unutar genske kazete na način da središnje mjesto ("core site") ostaje ispred gena, dok preostali dio *attC*-a dolazi na 3' kraju, odnosno nizvodno od gena. Izvorno je ovo mjesto nazvano 59-be budući da je sadržavalo 59 baza.<sup>108</sup> Uobičajeno je da se danas koristi termin *attC* rekombinacijsko mjesto.<sup>269</sup> Ovo područje iza genske kazete obično je

dugačko od 54 do 141 bp. Na oba kraja ima središnja mjesta sa sedam baza (1L, 1R), koji su savršeni palindromi; unutar njih nalaze se dva dodatna mjesta (2L i 2R) i njihova uloga nije potpuno jasna. U usporedbi s opisanim redoslijedima baza unutar 59 be za gene VIM-2, OXA-10 i *aacA4* može se uočiti mala razlika u duljini središnjeg dijela koje je s lijeve i desne strane omeđeno 2L, 1L, odnosno 2R i 1R palindromima.<sup>254</sup> U usporedbi s opisanim 59 be VIM-2 gena, središnje mjesto nešto je kraće, s 19 umjesto 23 baze. Ako se pogleda 59 be *aacA4* gena tu se redoslijed razlikuje za samo jednu bazu u korist InCRO integrona. Kod OXA-10 gena nema razlike u 59 be od već opisanog. Što se tiče genske kazete s parcijalnim genom *qacF*, ovoj genskoj kazeti nedostaje veći dio 59-be, odnosno ostao je samo strogo konzervirani središnji dio na početku genske kazete, uz deleciju čitavog inverznog središnjeg mjesta i preostalog dijela 59-be.

Rekonstruirajući njihovu strukturu može se zaključiti da se 59-be gena *bla<sub>VIM-2</sub>*, *bla<sub>OXA-10</sub>* i *aacA4* gotovo ne razlikuju od onih opisanih u literaturi, kao što prikazuje slika 35.

Jednak slijed genskih kazeta unutar MBL-pozitivnih izolata, odnosno prisustvo istog integrona upućuje na horizontalno širenje integrona, moguće unutar izolata *P. aeruginosa*, ali vjerojatno i između različitih bakterijskih vrsta, što je hipoteza proizašla nalazom istog integrona u indeks MBL izolatima za koje je naknadno utvrđeno da se u stvari radi o *Pseudomonas putida*.

**VIM-2**GGCAGATGCG**GCATAAC**ATGAAGTTGCAGCCGACC 23TTCTGGCGGCTGAACTTTCGGC**GTTATGC**CGCACTCACC**VIM-2 InCRO**

GGCAGATGCGGCATAACATGAAGTTGCAGCCGACC 19

TTCTGGCGGCTGAACTTTCGGC**GTTATGC**CGCACTCACC**OXA-10**CATCATTGGT**GGCTAAC**AAGTCGCTCAAGGTCGCTCCCT 54TGCCTGCCCCTTAGCTCCAAC**GTTAGCC**ACCAAGAAGG**OXA-10 InCRO**

ATTGGTGGCTAACAAAGTCGCTCAAGGTCGCTCCCT 54

TGCCTGCCCCTTAGCTCCAAC**GTTAGCC**ACCAAGAAGG**aacA4**ACGCAGGTTT**GCCTAAC**CCTTCCATCGAGGGGGACGTCC 13TTGGCCGCCCTCATGTCAAAC**GTTAGGC**ATCACAAAGT**aacA4 InCRO**

GCCTAACCTTCCATCGAGGGGGACGTCC 14

TTGGCCGCCCCTCATGTCAAAC**GTTAGGC**ATCACAAAGT

**Slika 35. Usporedba redoslijeda nukleotidnih baza u 59-be (attC) dijelu genskih kazeta za gene bla<sub>VIM-2</sub>, OXA-10 i aacA4 unutar integrona InCRO s opisanima u literaturi.**<sup>254</sup> U izvornoj strukturi 1L i 1R mjesta sa sedam baza su otisnuta masnim slovima, a 2L i 2R mjesta su podcrtana. U strukturi integrona InCRO žuto je označeno inverzno središnje mjesto (1L), crveno- središnje mjesto (1R), a mjesta 2L i 2R su podcrtana.



Osim uz pomoć automatiziranog sustava VITEK 2 (bioMerieux, Francuska), indeks izolati identificirani su uporabom početnica koje u PCR reakciji amplificiraju *ecfX* gen koji kodira ekstracitoplazmatski sigma faktor koji je specifičan i ograničen samo na *P. aeruginosa* i koji vjerojatno igra ulogu u preuzimanju hema i virulenciji. Specifičnost i osjetljivost *ecfX* PCR-a je visoka i ne amplificira DNK iz bilo koje druge *Pseudomonas* vrste.<sup>140</sup> Budući da je klinički značaj izolacije *Pseudomonas putida* puno manji od izolacije *Pseudomonas aeruginosa* još se jednom nameće zaključak da upravo okolišne bakterije mogu predstavljati izvrstan rezervoar integrona, odnosno gena za rezistenciju kako na antiseptike, tako i na antibiotike.<sup>64,245,270</sup>

S druge strane prisustvo VIM-2 gena, kao i ostalih gena koji su opisani u integronu InCRO potvrđuje hipotezu da su genske kazete s VIM-2 genom proširene po cijelom svijetu, ali ponekad čineći dio specifičnog, do tada u literaturi neopisanog integrona.

Što se tiče statističke obrade podataka o bolesnicima, a u svezi s mogućim utjecajem na duljinu hospitalizacije i ishod liječenja, uglavnom nije bilo statistički značajne razlike bez obzira na varijable koje smo uspoređivali, vjerojatno iz razloga što su bolesnici s imipenem-rezistentnim izolatima *P. aeruginosa* bili međusobno vrlo slični, a namjera rada nije bila uspoređivati takve bolesnike s kontrolnom skupinom, budući da bolesnici s osjetljivim izolatima nisu obrađivani. Uglavnom, muški bolesnici su bili dulje hospitalizirani od ženskih, pri čemu je razlika u duljini hospitalizacije s obzirom na spol bila na granici statističke značajnosti. Bolesnici koji su primali fluorokinolone prije izolacije otpornog pseudomonasa nešto su bili dulje hospitalizirani u odnosu na one koji nisu; i ova je razlika bila na granici statističke značajnosti. Fluorokinoloni naime, često se opisuju kao lijekovi koji imaju utjecaj na razvoj multirezistentnog fenotipa *P. aeruginosa* (u studiji Tacconelli i sur. OR bio je 3,21) pa time indirektno mogu utjecati i na dulju hospitalizaciju.<sup>271</sup> Osim fluorokinolona, na pojavu karbapenem-rezistentnog

pseudomonasa najviše utječe upravo potrošnja imipenema, a imipenem rezistentni izolati četiri puta su češće rezistentni i na ceftazidim te dva puta češće rezistentni na piperacilin s tazobaktamom.<sup>272,273</sup> Stoga se čini opravdano u okviru strategije propisivanja antibiotika kojoj su osnovni ciljevi smanjiti učestalost rezistentnih bakterija, smanjiti cijenu koštanja antibiotskog liječenja, a istovremeno poboljšati kvalitetu skrbi bolesnika, ograničiti propisivanje upravo fluoriranih kinolona i imipenema. U studiji Ben Ali i sur. u petogodišnjem razdoblju praćenja rezistencije *P. aeruginosa* na  $\beta$ -laktame, ciprofloksacin i amikacin, uz istovremeno provođenje strategije individualnog pristupa odabiru antimikrobne terapije uz krevet bolesnika od strane multidisciplinarnog tima (mikrobiolog, infektolog, ljekarnik), nakon pet godina smanjena je potrošnja  $\beta$ -laktama za 15%, fluorokinolona za 40%, a broj rezistentnih markera *P. aeruginosa* u invazivnim infekcijama za 50%.<sup>274</sup>

Djelotvorna terapija, odnosno ona koja je po antibiogramu djelovala na izoliranog pseudomonasa nije imala statistički značajan utjecaj na duljinu hospitalizacije bolesnika.

Boravak u jedinici intenzivnog liječenja značajno je utjecao na duljinu hospitalizacije bolesnika pa su značajno kraće bili hospitalizirani oni bolesnici koji nisu dio hospitalizacije proveli u JIL-u. Serotip 11 i serotip 12, koji su predstavljali dva najčešće izolirana serotipa pseudomonasa nisu značajno utjecali na duljinu hospitalizacije, kao ni izolacija najčešćeg rezistotipa, odnosno rezistotipa 1, iako je hospitalizacija bila dulja u bolesnika koji su u uzorcima imali *P. aeruginosa* rezistotipa I, odnosno serotipa 12, u odnosu na ostale rezistotipove i serotipove. U literaturi se uglavnom nalazi podatak da izolacija multi-rezistentnog *P. aeruginosa* prosječno produljuje hospitalizaciju za najmanje 6 dana te povećava cijenu koštanja hospitalizacije za nekoliko tisuća dolara u usporedbi s bolesnicima s osjetljivim izolatima pseudomonasa.<sup>196</sup> Kao što je i očekivano bolesnici s kroničnom

dijagnozom bili su dulje hospitalizirani od onih s akutnom, ali statistički bez značajne razlike. Naime, iz literaturnih podataka može se zaključiti da komorbiditet, uključujući i imunosupresivna stanja utječe na prolongiranu hospitalizaciju i veći mortalitet bolesnika s pseudomonasnom infekcijom.<sup>167</sup>

Medijan dobi odraslih bolesnika koji su preživjeli bio je 58 godina, a umrlih 66 godina. Statistički gledano razlika je bila na granici značajnosti što govori u prilog poznatoj činjenici da je starija životna dob rizični činitelj veće smrtnosti i kad se radi o infekcijama pseudomonasima.<sup>167,196</sup> Spol bolesnika nije imao značajan utjecaj na njihovo preživljavanje, iako je u skupini umrlih bolesnika bilo češće onih muškog spola što se u literaturi često navodi.<sup>275,276</sup> Prisustvo centralnog venskog katetera (CVK) imalo je značajan utjecaj na veću smrtnost što je uskladu s rezultatima iz literature gdje se intravaskularni kateter smatra činiteljem rizika za bakterijemiju, sepsu i veći mortalitet.<sup>277,278</sup> Iako mehanička ventilacija dokazano pogoršava prognozu bolesnika s pseudomonasnim infekcijama<sup>279</sup> mortalitet bolesnika na mehaničkoj ventilaciji nije bio veći od mortaliteta bolesnika koji nisu bili na mehaničkoj ventilaciji.

Boravak u JIL-u također nije imao statistički značajan utjecaj na konačan ishod bolesnika, kao ni operacijski zahvat tijekom hospitalizacije u kojoj je izoliran prikupljeni soj što nije u skladu s literaturnim podacima budući da je boravak u jedinici intenzivnog liječenja, kao i kirurški zahvat najčešće povezan s većim mortalitetom bolesnika s pseudomonasnom infekcijom.<sup>196,280</sup>

Zanimljivo je da terapija prema antibiogramu (tzv. "definitivna" ili "ciljana") za izolirani soj pseudomonasa nije imala statistički značajan utjecaj na konačan ishod bolesnika. U studiji Kang i sur.<sup>16</sup> neodgovarajuća terapija pogoršala je prognozu bolesnika, posebice ako se radilo o JIL-u pa je mortalitet bolesnika s infekcijom krvnožilnog sustava uzorkovanoj s *P. aeruginosa* s

odgovarajućom terapijom bio 27,7%, a s neodgovarajućom terapijom 43,3%. S druge strane u studiji Endimiani i sur.<sup>281</sup> adekvatna terapija nije utjecala na konačan ishod bolesnika s PER-1 pozitivnim izolatom *P. aeruginosa*.

Medijan ležanja bolesnika s imipenem-rezistentnim izolatima *P. aeruginosa* bio je 39 dana. U jedinicama intenzivnog liječenja medijan ležanja bio je 37 dana, a u ostalim odjelima 24 dana. U razdoblju od 2001. do 2007. godine prosječno trajanje liječenja u cijeloj bolnici bilo je 9,4 dana, a u jedinicama intenzivnog liječenja 6,7 dana.<sup>282</sup> Ovim radom potvrdila se činjenica da je cijena koštanja liječenja bolesnika s rezistentnim izolatima *P. aeruginosa* i nekoliko puta veća od prosječne cijene hospitalizacije. Tako su u studiji Carmeli i sur.<sup>272</sup> utvrdili su da je statistički značajno veća cijena hospitalizacije s obzirom na duljinu liječenja u bolesnika u kojih se tijekom hospitalizacije pojavio rezistentni izolat, te da je u toj grupi i mortalitet veći. Mortalitet bolesnika u ovoj disertaciji bio je 40,5% dok su Carmeli i sur. zabilježili u bolesnika s rezistentnim izolatima pseudomonasa mortalitet od 27%, a Furtado i sur.<sup>283</sup> iznose mortalitet među 63 bolesnika s imipenem rezistentnim izolatima od 49%, što je slično mortalitetu zabilježenom u ovom radu. Primjerice u Hrvatskoj, najčešći razlog hospitalizacije - kardiovaskularne bolesti, imale su 2002. godine prosječno vrijeme hospitalizacije od 11,6 dana, a od ukupno 39.658 hospitaliziranih zbog kardiovaskularnih bolesti (akutnih i kroničnih), umrlo je 11.979, odnosno 30%.<sup>284</sup>

Možemo dakle zaključiti da kolonizacija ili infekcija izolatima *P. aeruginosa* otpornim na karbapeneme produljuje hospitalizaciju i cijenu liječenja nekoliko puta, uz izrazito veću smrtnost bolesnika.

Zbog svega navedenog čini se opravdano ponovo preispitati sve ključne komponente antibiotske strategije unutar KBC-a - od multidisciplinarnog tima, pisanih smjernica za

antibiotsku terapiju, formulara i obrazaca naručivanja antibiotika, edukacije svih uključenih u skrb bolesnika, kontinuiranog praćenja potrošnje antibiotika, rezistencije bakterija, detekcije svakog bolesnika s multirezistentnim izolatom, i svakako mjera kontrole bolničkih infekcija. Ograničenje propisivanja karbapenema - posebice imipenema i fluorokinolona imalo bi zasigurno učinak na smanjenje broja multirezistentnih izolata *P. aeruginosa*, te indirektno smanjilo duljinu hospitalizacije i cijenu koštanja liječenja takvih bolesnika. Pravovremena detekcija bolesnika s multirezistentnim izolatom *P. aeruginosa* od strane tima za kontrolu bolničkih infekcija i pridržavanje bazičnim mjerama kontrole (poput pranja ruku prije i poslije kontakta s bolesnikom) zasigurno bi pridonijeli kontroli širenja rezistentih izolata.

## 8 ZAKLJUČCI

Učestalost izolata *P. aeruginosa* koji posjeduju metalo- $\beta$ -laktamaze u našem je ekološkom okruženju niska i iznosi među karbapenem-otpornim izolatima oko 3%.

Unatoč niskoj prevalenciji, izolati *P. aeruginosa* koji luče metalo- $\beta$ -laktamaze klinički su od izuzetne važnosti zbog neučinkovitosti gotovo svih raspoloživih terapijskih mogućnosti.

U sedmogodišnjem razdoblju praćenja nije došlo do klonske ekspanzije izolata *P. aeruginosa* koji luče metalo- $\beta$ -laktamaze, ali je istovremeno došlo do inter- i intra-specijes prijenosa integrona s genom koji luči metalo- $\beta$ -laktamaze, ukazujući na velik epidemiološki potencijal opisanih izolata.

Vrsta metalo- $\beta$ -laktamaze koja je nađena u izolatima *P. aeruginosa* je enzim VIM-2, koji je najčešće prisutna metalo- $\beta$ -laktamaza u europskim, posebice mediteranskim izolatima *P. aeruginosa*.

Enzim VIM-2 kodiran je genom *bla*<sub>VIM-2</sub> koji je lociran unutar prve genske kazete u integronu nazvanom InCRO.

InCRO nalazi se u sastavu svih metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih sojeva *P. aeruginosa*.

Integron InCRO za sada je jedinstveni opisani integron u ovom dijelu Europe veličine 3277 baznih parova.

InCRO integron sadržava genske kazete VIM-2, OXA-10, parcijalnu QAC-F, AAC4 i QAC-E-DELTA1 i lociran je na kromosomu svih MBL pozitivnih izolata.

Isti integron opisan je i u indeks izolatima *Pseudomonas putida* koji su prvi opisani kao nositelji gena VIM-2.

Integron unutar genetski različitih metalo- $\beta$ -laktamaza pozitivnih izolata pseudomonasa ukazuje na horizontalni prijenos genetskog materijala unutar i između vrsta što predmnijeva mogućnost prijenosa istog genetskog materijala i na druge vrste gram-negativnih bacila, poput enterobakterija.

Izolati *P. aeruginosa* koji ne posjeduju metalo- $\beta$ -laktamaze posreduju rezistenciju na karbapeneme hiperekspresijom cefalosporinaze AmpC, nedostatnom ekspresijom porina D na vanjskoj membrani i pojačanom aktivnošću efluksnih crpki.

Genotipizacija izolata ukazuje na dominantno postojanje dva klona i niza genetski jedinstvenih izolata *P. aeruginosa*.

Predominacija klonski srodnih izolata *P. aeruginosa* posebice je izražena u jedinici intenzivnog liječenja.

Serotipizacija i genotipizacija ukazuju na ekspanziju multirezistentnog serotipa O12 koji ima potencijal epidemijskog klona.

Laboratorijske metode utvrđivanja osjetljivosti *P. aeruginosa* na antibiotike nisu pouzdane i podložne su varijabilnosti, bez obzira radi li se o disk difuzijskoj metodi ili automatiziranim sustavima određivanja osjetljivosti.

Bolesnici kolonizirani ili inficirani karbapenem-rezistentnim izolatima *P. aeruginosa* dulje se hospitaliziraju od prosjeka i imaju veći mortalitet, na što značajno utječe boravak u jedinici intenzivnog liječenja i prisustvo centralnog venskog katetera.

## 9 SAŽETAK

Posljednih 20-ak godina u *Pseudomonas aeruginosa* sve češće se opisuju stečene  $\beta$ -laktamaze tzv. metalo- $\beta$ -laktamaze koje mogu biti VIM, IMP, GIM, SPM i AIM tipa, a hidroliziraju sve poznate  $\beta$ -laktame s izuzetkom aztreonama.

Cilj ovog rada bio kliničko-epidemiološko značenje izolata *P. aeruginosa* koji posjeduju metalo- $\beta$ -laktamaze, njihovu genetsku srodnost i proširenost, odnos serotipova i rezistotipova te provjeriti pouzdanost laboratorijskih metoda u testiranju osjetljivosti *P. aeruginosa* na antibiotike.

U razdoblju od 2001. do 2007. godine prikupljeno je ukupno 169 izolata *P. aeruginosa* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme s kliničkih odjela jedne regionalne bolnice. Svim izolatima određena je osjetljivost prema antipseudomonasnim antibioticima disk difuzijskom i mikrodilucijskom metodom (za ceftazidim i s dodatkom klavulanske i boroničke kiseline; za imipenem s dodatkom EDTA i fenantrolina), određen im je O-serotip te genetska srodnost uspoređena elektroforezom u pulzirajućem polju. Odnosom MIK-ova antibiotika procijenjena je aktivnost efluksnih crpki. Proteini vanjske membrane detektirani su SDS-PAGE elektroforezom. Geni koji kodiraju metalo- $\beta$ -laktamaze *bla<sub>VIM</sub>* i *bla<sub>IMP</sub>* istraženi su lančanom reakcijom polimeraze. Nizom parova početnica amplificiran je i sekvenciran integron koji sadržava gen za metalo- $\beta$ -laktamazu. Statistički su obrađeni klinički podatci bolesnika dobiveni retroaktivno iz anketnog listića koji je pratio svaki izolat pseudomonasa.

U šest izolata dokazano je prisustvo VIM-2 metalo- $\beta$ -laktamaze. Gen se nalazio u sastavu prve genske kazete u do sada neopisanom integronu lociranom na kromosomu nazvanom InCRO,



ukupne veličine 3277 parova baza. MBL pozitivni izolati pripadali su dvama klonovima i serotipovima O11 i O12. Otpornost na karbapeneme ostalih izolata *P. aeruginosa* posljedica je hiperekspresije AmpC  $\beta$ -laktamaze, nepostojanja proteina vanjske membrane OprD i pojačanog rada efluksnih crpki. Usporedba genotipova *P. aeruginosa* ukazala je na dominaciju dva klona, multirezistentnog klona *P. aeruginosa* O12 i drugog, u kojem prevladava serotip O11. Bolesnici s multirezistentnim izolatima pseudomonasa dulje su hospitalizirani i imaju veći mortalitet u odnosu na bolesnike koji nemaju multirezistentne izolate. Laboratorijske metode testiranja osjetljivosti *P. aeruginosa* na antibiotike nepouzidane su i podložne varijacijama.

## 10 SUMMARY

### METALLO- $\beta$ -LACTAMASES IN CARBAPENEM-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

In the last two decades, metallo- $\beta$ -lactamases of type VIM, IMP, GIM, SPM, and recently AIM are frequently described in *Pseudomonas aeruginosa*. Those enzymes hydrolyse all known  $\beta$ -lactams except aztreonam.

The aim of this study was to determine clinical and epidemiological significance of *P. Aeruginosa* strains producing metallo- $\beta$ -lactamases, their genetic similarity and distribution, relationship between serotypes and resistotypes and to check the reliability of laboratory methods in testing sensitivity of pseudomonas to antibiotics.

In the period from 2001 to 2007, a total of 169 *P. aeruginosa* isolates with reduced susceptibility to carbapenems were collected from all clinical departments of a regional hospital. The sensitivity to antipseudomonal antibiotics was determined by disk diffusion and microdilution methods (for ceftazidime alone and with addition of clavulanic and boronic acid; for imipenem alone and with EDTA and phenantroline). O-serotypes, resistotypes and PFGE-genotypes were determined for each strain and compared. Comparison of MICs to several antibiotics was used in estimation of efflux pumps' activity. Outer membrane proteins were detected by SDS-PAGE. Genes encoding metallo- $\beta$ -lactamases - *bla<sub>VIM</sub>* and *bla<sub>IMP</sub>* were detected by PCR. By using several primers' pairs the whole integron containing MBL gene was amplified and sequenced. Clinical data obtained retrospectively from the patients survey sheet accompanying every isolate were statistically analyzed.

In six isolates the presence of VIM-2 MBL was proved. Gene encoding the enzyme was located within the first gene cassette in so far undescribed integron called InCRO with 3277 bp. MBL-positive isolates belonged to two clones and were of serotype O11 and O12. Most of the MBL-negative *P. aeruginosa* isolates had derepressed AmpC, loss of OprD and increased activity of efflux pumps. Genotyping showed the dominance of two clones - one harboring multiresistant O12 *P. aeruginosa*, and other with prevailing O11 serotype. Patients with multiresistant pseudomonas isolates were hospitalized longer and had higher mortality compared to patients who had imipenem-resistant but not multiresistant isolates. Laboratory methods of testing the sensitivity of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to antibiotic are unreliable and subject to variations.

## 10 LITERATURA

1. Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas*. U: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, ur. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. izd. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999, str. 517-25.
2. Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect* 1998;4(5):242-7.
3. Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27(8):1421-8.
4. Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV, Michelsen PB. Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *J Clin Microbiol* 1989;27(1):35-40.
5. Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R, Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. *J Infect Dis* 1993;168(4):943-7.
6. Zawacki A, O'Rourke E, Potter-Bynoe G, Maccone AA, Harbarth S, Goldmann D. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and bloodstream infection associated with intermittent otitis externa in a healthcare worker. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25(12):1083-9.

7. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis 1983;5(2): 279-313.
8. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, Duinslaeger L, Cornelis P, Zizi M, Vanderkelen A. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol 2003;41(3):1192-202.
9. Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV Jr. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 1996;109(4):1019-29.
10. Wood DM, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev 2006;(1):CD004197.
11. Yoo JH, Choi SM, Lee DG, C JH, Shin WS, Min WS, Kim CC. Prognostic factors influencing infection-related mortality in patients with acute leukemia in Korea. J Korean Med Sci 2005;20(1):31-5.
12. Vraneš J. Pseudomonasi. Acinetobakter. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E i sur, ur. Medicinska bakteriologija i mikologija. 2. izd. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2001:211-23.
13. Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP, Ralston KV, Tarrand JJ, Samonis G. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes. Arch Intern Med 2000;160(4):501-9.
14. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis 2005;18(4):306-13.

15. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(1):43-8.
16. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Res* 2005;11(1):68-74.
17. Bergogne-Berezin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs* 1999;58(1):51-67.
18. Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, Kim EC, Choe KW. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003;37(6):745-51.
19. Kollef M. Appropriate empirical antibacterial therapy for nosocomial infections: getting it right the first time. *Drugs* 2003;63(20):2157-68.
20. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahn DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1681-8.
21. Klibanov OM, Raasch RH, Rublein J. Single versus combined antibiotic therapy for gram-negative infections. *Ann Pharmacother* 2004;38(2):332-7.

22. Linden PK, Kusne S, Coley K, Fontes P, Kramer DJ, Paterson D. Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003;37(11):e154-60.
23. Wolinsky E, Hines JD. Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin in patients with renal disease. N Engl J Med 196;266:759-62.
24. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med 2006;119(6 Suppl. 1):S3-10.
25. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis 2002;34(5):634-40.
26. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother 2001;47:247-50.
27. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, AmpC and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(5):1633-41.
28. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl. 1):87-102.
29. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980;289(1036):321-31.
30. Bush K, Jacoby G A, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995;39(6):1211-33.

31. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):2043-8.
32. Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1085-90.
33. Schweizer HP. Efflux as mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2003;2:48-62.
34. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organism. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001;3:255-64
35. Zihra-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;43:287-91.
36. Livermore DM. Radiolabeling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of  $\beta$ -lactamase activity by PBP-5. *J Antimicrob Chemother* 1987;19:733-42.
37. Bellido F, Veuthey C, Blaser J, Bauernfeind A, Pechère JC. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2001;45:480-4.
38. Chen YH, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J Microbiol* 1995;43(4):300-9.



39. Sanschagrín F, Bejaoui N, Levasque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(8):1966-72.
40. Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in 21<sup>st</sup> century: characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):933-51.
41. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR. Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):1-4.
42. Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo QA. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended spectrum  $\beta$ -lactamase. *BMC Infect Dis* 2006;6:52(1-9)
43. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42(2):128-31.
44. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(1):104-14.
45. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(9):2598-603.
46. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA  $\beta$ -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:11-8.

47. Naas T, Nordmann P. OXA-type  $\beta$ -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999;5:865-79.
48. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:2188-95.
49. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(1):147-51.
50. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub> a new integron borne metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1584-90.
51. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemase: a problem waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000;3:489-95.
52. Gupta V. Metallo  $\beta$  lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2008; 17(2):131-43.
53. Bush K. Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;3(3):259-76.
54. Livermore DM. B-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
55. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 1988;170(6):2673-78.
56. Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine  $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(7):1460-4.

57. Walsh TR. The emergence and implications of metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl.6):2-9.
58. Bush K. Metallo- $\beta$ -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl. 1):S48-S53.
59. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24(Suppl. 1):S19-45.
60. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(2):223-32.
61. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):306-25.
62. Young D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci. Cof. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology: Washington, DC, 2007.
63. Garau G, Garcia-Saez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, Frère JM, Dideberg O. Update of the standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:2347-9.
64. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:257-66.
65. Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, Amicosante G, Frere JM, Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa*

- 101/1477 metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:902-6.
66. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4654-61.
67. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:582-7.
68. Bellais S, Mimoz O, Leotard S, Jacolot A, Petitjean O, Nordmann P. Efficacy of  $\beta$ -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2032-4.
69. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>IMP</sub>) in gram-negative rods resistant to broad spectrum  $\beta$ -lactams. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):2909-13.
70. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999;353:899-900.
71. Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitao R, Peixe L, Duarte A. Molecular characterization of *bla*<sub>IMP-5</sub>, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215(1):33-9.
72. Riccio ML, Franceschini N, Boshi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of

- Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(5):1229-35.
73. Soraya SA, Jones RN, Gales AC, Sader HS. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres. 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):140-1.
74. Pai H, Kim JW, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):480-4.
75. Bedenić B. Beta laktamaze i njihova uloga u rezistenciji II. dio: Beta laktamaze u 21. stoljeću. *Liječ Vjesn* 2005;127(1-2):12-21.
76. Hanson HD, Hossain A, Buck I, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- $\beta$ -lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(6):2272-3.
77. Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M. Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(5):901-8.
78. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla<sub>VIM-2</sub> carbapenem

- hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and two novel aminoglycosides resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):546-52.
79. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 2009;58:1133-48.
80. Lepšanović Z, Libisch B, Tomanović B, Nonkovići Z, Balogh B, Fūzi M. Characterisation of the first VIM metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008;55(4):447-54.
81. Yan J, Ko WC, Chuang CL, Wu JJ. Metallo- $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates in a university hospital in Taiwan and identification of VIM-3 a novel variant of VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224-8.
82. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. bla<sub>VIM-7</sub>, an evolutionary distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):329-32.
83. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castañeda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- $\beta$ -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5094-101.
84. Marchiaro P, Tomatis PE, Mussi MA, Pasteran F, Viale AM, Limansky AS, Vila AJ. Biochemical characterization of metallo- $\beta$ -lactamase VIM-11 from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(6):2250-2.
85. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A, VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from

- Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):5153-6.
86. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A. Characterization of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(10):3589-96.
87. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2977-9.
88. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonomidis A, Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1325-30.
89. Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo- $\beta$ -lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(3):1225-7.
90. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(2):648-50.

91. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y, Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. isolates disseminated in a Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):868-71.
92. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(5):673-9.
93. Gales AC, Menezes, LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52(4):699-702.
94. El Salabi A, MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First Report of the metallo- $\beta$ -lactamase, SPM-1, in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):582.
95. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005;14 (Suppl 4):S276-8.
96. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-58.
97. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):1766-71.
98. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria: *J Antimicrob Chemother* 1999;43:1-4.



99. Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother* 1995;39:155-62.
100. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM. Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol* 1998;29:477-90.
101. Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 1993;9:41-52.
102. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with 59-be site. *Mol Microbiol* 2002;46:1415-27.
103. Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundström L, Skold O, Swedberg G, Skurray RA. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(4):761-8.
104. Fluit AC, Schmitz JF Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 2003;10:272-88.
105. Poirel L, Lambert T, Türkoglu S, Ronco E, Gaillard JL, Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*<sub>VIM-2</sub> carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:546-52.
106. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim J, Livermore DM. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

- and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1053-68.
107. Partridge SR, Collis CM, Hall RM. Class 1 integron containing new gene cassette, *aadA10*, associated with *Tn1404* from R151. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(8):2400–8.
  108. Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. U: Gogarten MB, Gogarten JP, Olendzenski L, ur. *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux. Methods in Molecular Biology. Vol. 532. Humana Press (Springes Science) 2009:103-25.*
  109. Collis CM., Recchia GD, Kim MJ, Stoke HW, Hall RM. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrases. *Int J Bacteriol* 2001;183:2535-42.
  110. Brown H, Stokes HW, Hall RM. The integron *In0*, *In2*, and *In5* are defective transposon derivatives. *J. Bacteriol* 2002;178:4429-37.
  111. Brachman PS. *Epidemiology. U: Baron S, ur. Medical microbiology, 4. izd. Galveston: The University of Texas Medical Branch and Galveston 1996.*
  112. Tsakris A, Tassios PT, Polydorou F, Papa A, Malaka E, Antoniadis A, Legakis NJ. Infrequent detection of aquired metallo- $\beta$ -lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas* isolates in a Greak hospital. *Clin Microbiol Infect* 2003;9(8):846-51.
  113. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Legakis NJ, Maniatis AN. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants *bla<sub>VIM-2</sub>* and *bla<sub>VIM-4</sub>*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1409-14.

114. Tsakris A, Porunaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 2000;38:1290-2.
115. Kim IS, Lee NY, Ki CS, Oh WS, Peck KR, Song JH. Increasing prevalence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and molecular typing of metallo- $\beta$ -lactamase producers in a Korean hospital. *Microb Drug Res* 2005;11(4):355-9.
116. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A, Cafiso V, Amicosante G, Stefani S, Venditti. Infections with VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J of Clin Microbiol* 2009;47(11):3514-9.
117. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, VIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:3129-35.
118. Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:308-13.
119. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucl. Acids Res* 2005;33:729-33.
120. Sardelić S, Pallecchi L, Punda Polić V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1022-3.

121. Bošnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A, Jarža-Davila N, Šuto S, Kalenić S. VIM-2  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. Scand J Infect Dis 2010;42:193-197.
122. Tambić Andrašević A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2008. godini. U: Tambić T, Tambić Andrašević A, ur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008. godini. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2009:9-98.
123. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol 2003;41(1):351-8.
124. Carmeli Y, Eishelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman, DeGirolami P, Samore M. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1998;36(2):595-7.
125. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S16. Wayne, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS), 2006.
126. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ i sur. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406(6799):959-64.

127. Riccio ML, Docquier JD, Dell'Amico E, Luzzaro F, Amicosante G, Rossolini GM. Novel 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1746-8.
128. Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, Nucleo E, Pollini S, Spalla M, Daturi R, Romero E, Rossolini GM. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004;42: 2523–9.
129. Yoneyama H, Yamano Y, Nakae T. Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochem Biophys Res Comm* 1995;213(1):88-95.
130. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L. Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4388-90.
131. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2755-9.
132. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Prevalence and characterization of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48(2):131-5.

133. Buzzoni V, Blazquez J, Ferrari S, Calò S, Venturelli A, Costi MP. Aza-boronic acids as non- $\beta$ -lactam inhibitors of AmpC- $\beta$ -lactamase. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(15):3979-83.
134. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian J Med Microbiol* 2004;22:75-80.
135. Johnson JL. Similarity analysis of DNAs. U: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, ur. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994:655-82.
136. Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3(2):117-27.
137. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* 2001;39:1865-70.
138. Yoneyama H, Yoshihara E, Nakae T. Nucleotide sequence of the protein D2 gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(8):1791-3.
139. Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Met* 2007;70 (1):20-9.
140. Woodford N, Ellington M, Coelho J, Turton J, Ward M, Brown S, Amyes S, Livermore D. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Ag* 2006;27(4):351-3.

141. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, Enomoto K. Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(2):626-8.
142. Pallecchi L, Riccio ML, Docquier J, Fontana R, Rossolini GM. Molecular heterogeneity of bla<sub>VIM-2</sub>-containing integrons from *Pseudomonas aeruginosa* plasmids encoding the VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase. *FEMS Microbiol Lett* 2001;195:145-50.
143. Kaufman ME. Pulsed field electrophoresis. Iz: Woodford N, Johansons AP, ur. *Methods in molecular medicine Vol 15: Molecular Bacteriology Protocols and Clinical Applications* Totowa, NJ Humana Press Inc, 1998.
144. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. izd. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
145. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
146. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK i sur. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;13 (Suppl 3):1-46.
147. Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:1129-35.
148. Campbell M, Mahenthalingam E, Speert D. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *P. aeruginosa*. *J Clin. Microbiol* 2000;38:4614-5.

149. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P Extended spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(14):4681-5.
150. Tsao SG, Brunk CF, Pearlman RE. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Anal Biochem* 1983;131:365-72.
151. Livermore DM, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006;14:413–20.
152. Rahal JJ. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections. *Crit Care* 2008;12(Suppl 4):S5.
153. Holder IA, Volpel K, Ronald G, Paranchych W. Studies on multiple *Pseudomonas aeruginosa* isolates from individual burn patients by RFLP, O antigen serotyping and antibiogram analysis. *Burns* 1995;21(6):441-4.
154. Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients *J Clin Microb* 2001;39(11):3976-81.
155. Thomassen MJ, Demko CA, Boxerbaum B, Stern RC, Kuchenbrod PJ. Multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1979;140:873–80.
156. Orsi GB, Raponi M, Franchi C, Roco M, Mancini C, Venditti M. Surveillance and infection control in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:321-5.
157. Trilla A. Epidemiology of nosocomial infections in adult intensive care units. *Intens Care Med* 1994;20(3):S1-S4.
158. Murphy TF. *Pseudomonas aeruginosa* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15(2):138-42.



159. Vincent JL, Bihari DL, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin M i sur. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of infection in Intensive Care (EPIC) study. *J Am Med Ass* 1995;74:639-44.
160. Bielecki P, Glik J, Kawecki M, Martins dos Santos VA. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression *Biotechnol Lett* 2008;30(5):777-90.
161. Masaadeh HA, Jaran AS. Incident of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection. *Am J Infect Dis* 2009;5(1):1-6.
162. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jorgensen B, Andersen AS, Krogfelt K, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Non-random distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2009;47:4084-9.
163. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11:609-22.
164. Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* . *Rev Infect Dis*. 1984;6(Suppl 3):S627-42.
165. Benett JV. Nosocomial infections due to *Pseudomonas*. *J Infect Dis* 1974;130(Suppl):S4-S7.
166. A'Court CHD, Garrard CS, Crook D, Bowler I, Conlon C, Peto T, Anderson E. Microbiological lung surveillance in mechanically ventilated patients, using non-directed bronchial lavage and quantitative culture. *QJ Med* 1993;86:635-48.

167. Flaherty JP, Stosor V. Nonfermentative gram-negative bacilli. U: Mayhall CG, ur. Hospital epidemiology and infection control, 3. izd. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004:575-602.
168. CDC. Nosocomial infection surveillance. U: CDC Surveillance Summaries. 1984;33(3SS):17SS-29SS.
169. Watine J. Is the European interhospital clonal spread of serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* related to the patients' prolonged carriage duration? Infect Control Hosp Epidemiol 1999;20(7):460-1.
170. Pitt TL, Livermore DM, Miller G, Vatopoulos A, Legakis NJ. Resistance mechanism of multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Europe. J Antimicrob Chemother 1990;26:319-28.
171. Vraneš J, Brkić I, Horonitz M. Differences in the antigenic structure and production of haemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of isolation sites. Acta Clin Croat 2001;40:85-91.
172. Muller-Premru M, Gubina M. Serotype, antimicrobial susceptibility and clone distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital. Zentralbl Bacteriol 2000;289(8):857-67.
173. Bouza E, Garcia-Garrote F, Cercenado E, Marin M, Diaz MS. *Pseudomonas aeruginosa*: a survey of resistance in 136 hospitals in Spain. The Spanish *Pseudomonas aeruginosa* Study Group. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(4):981-2.
174. Jamasbi RJ, Proudfoot EM. Phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: rate of occurrence and distribution of different serotypes, antimicrobial susceptibility profiles. Lab Med 2008;39(3):155-61.

175. Bert F, Lambert-Zechovsky N. Antibiotic resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year surveillance study in a French hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 1997;9(2):107-12.
176. Bert F, Lambert-Zechovsky N. Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:809-13.
177. Drougka E, Panagea T, Chini V, Foka A, Christofidou M, Spiliopoulou I. Clonal types and serotypes of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates spread in a university hospital in Greece. 17th ECCMID, Njemačka, 2007. Broj sažetka 1733-856.
178. Pitt TL, Sedlak-Weinstein E, Cripps AW, Kyd JM, Foxwell AR. *Pseudomonas aeruginosa*: the potential to immunise against infection. *Exp Op Biol Ther* 2005;5(7):967-82.
179. Pitt TL, MacDougall J, Penketh ARL, Cooke EM. Polyagglutinating and non-typable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1986;21:179-86.
180. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Antimicrobial susceptibility of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:299-301.
181. Chen YH, Peng CF, Lu PL, Tsai JJ, Chen TP. In vitro activities of antibiotic combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Kaohsiung J Med Sci* 2004;20(6):261-7.
182. Dubois V, Arpin C, Melon M, Melon B, Andre C, Frigo C, Quentin C. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of

- cefepim-amikacin therapy and analysis of  $\beta$ -lactam resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39(6):2072-8.
183. Siegman Igra Y, Ravona R, Primerman H, Giladi M. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: an analysis of 123 episodes with particular emphasis on the effect of antibiotic therapy. *Int J Infect Dis* 1998;2:211-5.
184. Gimarellou H. Prescribing guidelines for severe pseudomonas infections *J Antimicrob Chemother* 2002;49:229-33.
185. Gupta S, Govil D, Kakar PN, Prakash O, Arora D, Das S, Govil P, Malhotra A. Colistin and polymyxin B: A re-emergence. *Indian J Crit Care Med* 2009;13:49-53.
186. Nation RL, Li J. Colistin in 21st century. *Curr Op Infect Dis* 2009;22(6):535-43.
187. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(12):3322-7.
188. Thomsberry C, Brown SD, Yee YC, Bouchillon SK, Marler JK, Rich T. In vitro activity of cefepime and other antimicrobials. Survey of European isolates. *J Antimicrob Chemother* 1993;32(Suppl b):31-53.
189. Pena C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Dominguez MA, Oliver A, Pujol M, Ariza J. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2381-7.
190. Cerbara EF, Hashimoto A, Sader HS. In vitro antimicrobial activity of cefepime, ceftazidime, and ceftazidime against clinical isolates of imipenem-resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa* (IRPA). Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf. Antimicrob Agents Chemother 1999;39:183. Ab 2273.
191. Voutsinas D, Mavroudis T, Avlami A, Giamarellou H. Comparative in vitro activity of cefepime (BMY 28142) against multiresistant nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol 1989;8(10):917-19.
  192. Yahav D, Paul M, Fraser A, Sarid N, Leibovici L. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2007;7(5):338-48.
  193. Wong-Beringer A, Beringer P, Lovett MA. Successful treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* meningitis with high-dose ciprofloxacin. Clin Infect Dis 1997;25(4):936-7.
  194. Drago L, DeVecchi E, Nicola L, Colombo A, Guerra A, Gismondo MR. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin in combination with cefepime, ceftazidime, imipenem, piperacillin-tazobactam and amikacin against different *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes and *Acinetobacter* spp. Chemotherapy 2004;50:202-10.
  195. Landman D, Quale JM, Mayorga D, Adedeji A, Vangala K, Ravishankar J, Flores C, Brooks S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. Arch Intern Med 2002;162:1515-20.
  196. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. Pharmacother 2005;25(10):1353-64.

197. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum  $\beta$ -lactam agents. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):1101-4.
198. Juretschko S, Labombardi VJ, Lerner SA, Schreckenberger PC; Pseudomonas AST Study Accuracies of  $\beta$ -Lactam Susceptibility Test Results for *Pseudomonas aeruginosa* with Four Automated Systems (BD Phoenix, MicroScan WalkAway, Vitek, and Vitek 2). *J Clin Microbiol* 2007;45(4):1339-42.
199. Henwood JC, Livermore DM, James D, Warner M and the Pseudomonas Study Group. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:789-99.
200. Livermore DM, Chen HY. Quality of antimicrobial susceptibility testing in the UK: a *Pseudomonas aeruginosa* survey revisited. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:517-22.
201. Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, Giamarellou H. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(5):434-9.
202. Jones RN, Andereg TR, Swenson JM. Quality control guidelines for testing gram-negative control strains with polymyxin B and colistin (polymyxin E) by standardized method. *J Clin Microbiol* 2005;43:925-7.
203. Tan TY, Ng LS. Comparison of three standardized disc susceptibility testing method for colistin. *J Antimicrob Chemother* 2007;58:864-7.

204. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* 2001;39:183-90.
205. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2006;55:1619-29.
206. Sofianou D, Tsakris A, Skoura L, Douboyas J. Extended high-level cross-resistance to antipseudomonal antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40(5):740-2.
207. Trouillet JL, Vuagnat A, Combes A, Kassis N, Chastre J, Gibert C. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due to piperacillin-resistant versus piperacillin-susceptible organisms. *Clin Infect Dis* 2002;34(8):1047-54.
208. Tacconelli E, Tumbarello M, Bertagnolio S, Citton R, Spanu T, Fadda G, Cauda R. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: analysis of trends in prevalence and epidemiology. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):220-1.
209. Dong F, Xu X, Song W, Lu P, Yu S, Yang Y, Shen X. Characterization of multidrug-resistant and metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chin Med J* 2008;121(17):1611-6.
210. Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ. Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect* 1989;103(3):565-76.
211. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R, Mugnaioli C, Pini B, De Luca F, Perilli M, Pollini S, Spalla M, Amicosante G, Toniolo A, Pagani L. First countrywide survey of

- acquired metallo- $\beta$ -lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(11):4023-9.
212. Giakkoupi P, Petrikkos G, Tzouvelekis LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Spread of integron-associated VIM-type metallo- $\beta$ -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003;41:822-5.
213. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Perez JL, Oliver A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4329-35.
214. Kimura S, Alba J, Shiroto K, Sano R, Niki Y, Maesaki S, Akizawa K, Kaku M, Watanuki Y, Ishii Y, Yamaguchi K. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 2005;43:458-61.
215. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL.. Molecular epidemiology of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:294-8.
216. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Legakis NJ, Maniatis AN. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants *bla*<sub>VIM-2</sub> and *bla*<sub>VIM-4</sub>. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1409-14.



217. Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Ag Chemother* 2005;49(11):4733-8.
218. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. The inhibition of class C  $\beta$ -lactamases by boronic acids. *Biochem J* 1983;209:229-33.
219. Hope R, Warner M, Hill R, Livermore DM. Phenotypic AmpC detection – which inhibitor is best? 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Barcelona, Spain, 19–22 April 2008. P876.
220. Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob Ag Chemother* 1999;43(4):882-9.
221. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended spectrum serine- $\beta$ -lactamase and VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001;7(5):910-1.
222. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Ag Chemother* 2003;47(8):2385-92.
223. Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2265–9.

224. Williams RJ, Livermore DM, Lindridge MA, Said AA, Williams JD. Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 1984;17:283-93.
225. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000 31;406(6799):959-64.
226. Join-Lambert OF, Michea Hamzhepour M, Kohler T, Chau F, Faurisson F, Dautrey S, Vissuzaine C, Carbon C, Pechere JC. Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. Antimicrob Ag Chemother 2001;45:571-76.
227. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2005;56(1):20-51.
228. Lomovskaya O, Watkins W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. J Mol Microbiol Biotechnol 2001;3(2):225-36.
229. Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain A, Caceres NE, Tulkens PM, Van Bambeke F. Combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2007;59(3):378-86.
230. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux System, AmpC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1633-41.

231. Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. FEMS Microbiol Lett. 2004;236(1):137-43.
232. Hancock REW Resistance mechanisms in *P. aeruginosa* and other nonfermentative bacteria Clin Infect Dis 1998;27(Suppl. 1):S93-S99.
233. Quinn JP, Studemeister AE, DiVincenzo CA, Lerver SA. Resistance to imipenem in *P. aeruginosa*: clinical experience and biochemical mechanisms. Rev Infect Dis 1988;10:892-8.
234. El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijsers B, Kronvall G, Wretling B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. APMIS 2005;113(3):187-96.
235. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992;36(9):2046-8.
236. Mavroidi A, Tsakris A, Txelepi E, Pournaras S, Loukova V, Tzouvelekis LS. Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. J Antimicrob Chemother 2000;46:1041-2.
237. Cornaglia G, Mazzariot A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- $\beta$ -lactamase. Clin Infect Dis 2000;31:1119-25.
238. Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM. *bla*<sub>VIM-2</sub> cassette-containing novel integrons in metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

- and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1053-8.
239. Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fūzi M, Kronvall G, Rossolini GM. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4309–15.
240. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta. Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Ag Chemother* 1996;40(2):349-53.
241. Lagatolla C, Tonin EA, Monti-Bragadin C, Dolzani L, Gombac F, Bearzi C, et al. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. *Emerg Infect Dis* 2004;10(3):535-8.
242. Tsukayama DT, van Loon HJ, Cartwright C, Chmielewski B, Fluit AC, van der Werken C, Verhoef J; RADAR trial. The evolution of *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic rotation in a medical intensive care unit: the RADAR-trial. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24(4):339-45.
243. Fluit AC, Verhoef J, Schmitz, FJ. Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. European Sentry Participants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:370-4.
244. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, Ghysels B, Cornelis P. *P. aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol* 2002;4:898-911.

245. Gillings MR, Xuejun D, Hardwick SA, Holley MP, Stokes HW. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? *ISME J* 2009;3(2):209-15.
246. Huang L, Cagnon C, Caumette P, Duran R. First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes. *Appl Env Microbiol* 2009;75(11):3823-5.
247. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48(4):1433-4.
248. Quinteira S, Sousa JC, Peixe L. Characterization of In100, a New Integron Carrying a Metallo- $\beta$ -Lactamase and a Carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 January; 49(1):451–3.
249. Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R, Rossolini GM. In70 of plasmid pAX22, a bla<sub>VIM-1</sub>-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1249-53.
250. Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. The sequence of PSE-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:134-6.
251. Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques Ede A. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microb Drug Resist* 2006;12:103-8.
252. Koh TH, Yamaguchi K, Ishii Y. Characterisation of the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-6 and its genetic support. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32 (5):446-9.

253. Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minarovits J, Knausz M, Watine J, Ternak G, Kenez E, Kustos I, Rokusz L, Szeles K, Balogh B, Füzi M. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas* spp. in Hungary. *Antimicrob Ag Chemother* 2006;50(12):4220-3.
254. Stokes, HW, O’Gorman DD, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM. Structure and function of 59-be element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 1997;26:731-45.
255. Flint AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:761-70.
256. Ploy M C, Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:2557–63.
257. Martinez E, de la Cruz F. Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* 1990;9:1275-81.
258. Miller GH, Sabatelli FJ, Naples L, Hare RS, Shaw KJ. The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms—combined results of surveys in eight regions of the world. *J Chemother* 1995;7:17-30.
259. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:185-91.
260. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138–63.

261. Shahid M, Malik A. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. *Indian J Med Res* 2005;122:324-9.
262. Lambert T, Ploy MC, Courvalin P. A spontaneous point mutation in the *aac(6'')-Ib* gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6''-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:297-304
263. Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla<sub>GES-1</sub>* and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6'')-Ib* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Ag Chemother* 2002;46(3):638-45.
264. Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW. Integons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol* 1994;176:6286-94.
265. Partridge SR., Brown HJ, Stokes HW, Hall RM. Transposons *Tn1696* and *Tn21* and their integrons *In4* and *In2* have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1263-70.
266. Gaze WH, Abdousslam N, Hawkey PM, Wellington EMH. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(5):1802-7.
267. McBain AJ, Ledder RG, Moore LE, Catrenich CE, Gilbert P. Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(6):3449-56.

268. Kucken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of qacE and qacEDelta1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett 2000;183:95-8.
269. Rowe-Magnus DA, Mazel D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol. 2002;292(2):115-25.
270. Stoczko M, Frere JM, Rossolini GM., Docquier JD. Functional diversity among metallo- $\beta$ -lactamases: characterization of the Car-1 enzyme of *Erwinia carotovora*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2473-9.
271. Tacconelli E, Tumbarello M, Bertagnolio S, Citton R, Spanu T, Fadda G, Cauda R. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: analysis of trends in prevalence and epidemiology. Emerg Infect Dis 2002;8(2):220-1.
272. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Intern Med 1999;159(10):1127-52.
273. Troillet N, Samore MH, Carmeli Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : risk factors and antibiotic susceptibility patterns. Clin Infect Dis 1997;25(5):1094-8.
274. Ben Ali A, Nazal E, Hamza L, Chalfine A, Gonot j, N'Guyen Van J, Kitzis M, Bezie Y, Carlet J, Goldstein F. Decrease Antibiotic Resistance of Nosocomial Bacteria: Results of a Five Years Policy Involving an Ambulatory Infectious Team; Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (43rd: 2003: Chicago, Ill.) Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 2003;43:K-1420.



275. Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 2004;125(2):607-16.
276. Al-Hasan MN, Wilson J, Lahr B, Eckel-Passow J, Baddour L. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. Am J Med 2008;121(8):702-8.
277. Rello J, Ochagavia A, Sabanes E, Roque M, Mariscal D, Reynaga E, Valles J. Evaluation of outcome of intravascular-catheter-related infections in critically ill patients. Am J respir Crit Care Med 2000;162:1027-30.
278. Al-Rawajfah OM, Stetzer F, Beauchamp Hewitt J. Incidence of and risk factors for nosocomial bloodstream infections in adults in the United States, 2003. Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30(11):1036-44.
279. Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valles J, Niederman MS. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. Crit Care Med 1997;25:1862-7.
280. Vidal F, Mensa J, Almela M, Martinez JA, Marco F, Casals C, Gatelli M, Soriano E, Jimenez de Anta MT. Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment : Analysis of 189 episodes. Arch Intern Med 1996;156(18):2121-6.
281. Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo QA. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended spectrum  $\beta$ -lactamase. BMC Infect Dis 2006;6:52(1-9).
282. Služba Plana i analize KBC Split: Statističko izvješće za 2001.-2007. godinu, Split: KBC Split, 2008.

283. Furtado GH, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, Wey SB, Medeiros EA. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. *J Crit Care* 2009;24(4):625(9)-625(14).
284. Kardiovaskulame bolesti u Republici Hrvatskoj, Zagreb 2004. Dostupno na [www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr).

## 12 ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu, 28. ožujka 1965. godine, djevojačkog prezimena Bučan. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Studiju u Splitu 1989. godine.

Od 1991. do 1996. godine radila sam kao znanstveni novak u Odjelu za kliničku farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Split.

Poslijediplomski studij iz kliničke farmakologije završila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te 1995. godine obranila magistarski rad pod nazivom "Učinak noradrenalina na površinske vene šake bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom procjenjen testom venokonstrikcije".

Specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije položila sam 2000. godine, od kada radim kao specijalist u Odjelu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split.

Od 1998. do 2006. godine radila sam kao asistent na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Od studijskih putovanja ističem jednomjesečni boravak u Marseilles-u, Francuska, u referentnom centru SZO za istraživanje rikecija (kod prof. D. Raoulta) te tromjesečni boravak u Sieni, Italija, 2005. godine (kao dobitnica stipendije Američkog društva za mikrobiologiju) u Odjelu za molekularnu mikrobiologiju Poliklinike "Le Scotte" (kod prof. G.M. Rossolinia). Objavila sam 29 znanstvenih i stručnih radova (od toga 11 indeksiranih u CC-u), koautor sam 36 sažetaka s kongresa i simpozija, kourednica jedne knjige, autor nekoliko poglavlja u knjigama.

Članica sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog društva za medicinsku mikrobiologiju i Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i zarazne bolesti.

Udana sam, majka dvije prekrasne kćeri.

**Prilog 1**

**OBRAZAC ZA RETROSPEKTIVNO PRIKUPLJANJE PODATAKA O  
BOLESNICIMA U KOJIM JE IZOLIRAN *Pseudomonas aeruginosa* OTPORAN NA  
KARBAPENEME**

Broj protokola/godina:

Redni broj soja:

Ime i prezime bolesnika

Spol:

Dob:

Odjel:

Dijagnoza osnovnog stanja/bolesti:

Dijagnoza vezana za uzorak:

Datum uzorka iz kojeg je izoliran soj:

Vrsta uzorka:

Antibiotik do izolacije soja: (vrsta, doza, dužina trajanja terapije):

Antibiotik nakon izolacije soja: (vrsta, doza, dužina trajanja terapije)

Prijašnji mikrobiološki uzorci/izolati:

Bolesnik na mehaničkoj ventilaciji:      DA              NE

Urinski kateter:      DA              NE

Centralni venski kateter:      DA              NE

Drugi biomaterijali:

Kirurški zahvat:      DA              NE

Ukupna duljina hospitalizacije:

Konačan ishod bolesnika:





