



Središnja medicinska knjižnica

Erdeljić, Viktorija (2012) *Utjecaj primjene antimikrobne terapije na selekciju mikroorganizama koji produciraju beta-laktamaze proširenog spectra (AmpC i ESBL) i ishod liječenja bolesnika [The impact of antimicrobial consumption on the selection of extended-spectrum beta-lactamases producing (ESBL, AmpC) strains and on patients outcomes]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1561>

University of Zagreb Medical School Repository

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Viktorija Erdeljić

**Utjecaj primjene antimikrobne terapije
na selekciju mikroorganizama koji
produciraju beta-laktamaze proširenog
spektra (AmpC i ESBL) i ishod
liječenja bolesnika**

DISERTACIJA



Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Viktorija Erdeljić

**Utjecaj primjene antimikrobne terapije
na selekciju mikroorganizama koji
produciraju beta-laktamaze proširenog
spektra (AmpC i ESBL) i ishod
liječenja bolesnika**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena u Klinici za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. sc. Igor Francetić

SADRŽAJ

UVOD	6
<i>Problem rezistencije bakterija na antimikrobne lijekove</i>	6
<i>Beta-laktamaze proširenog spektra</i>	8
Bush-Jacoby-Medeiros	10
Porijeklo ESBL	10
SHV	11
TEM.....	12
CTX-M i Toho beta-laktamaze.....	12
OXA.....	14
PER.....	14
VEB-1, BES-1 i druge ESBL.....	15
AmpC beta-laktamaze	15
<i>Epidemiologija ESBL</i>	16
Europa.....	16
Ostatak svijeta.....	18
Epidemiologija ESBL u Hrvatskoj	19
Molekularna epidemiologija infekcija sa ESBL producirajućim mikroorganizmima	21
<i>Kliničko značenje i utjecaj produkcije ESBL beta-laktamaza</i>	23
<i>Liječenje infekcija s ESBL mikroorganizmima</i>	28
<i>Detekcija ESBL i AmpC beta-laktamaza u mikrobiološkom laboratoriju</i>	30
Metode detekcije ESBL	30
Metode detekcije AmpC beta-laktamaza	31
<i>Poticaj za istraživanje</i>	33
CILJ I I HIPOTEZA	35
CILJ RADA	35
SPECIFIČNI CILJEVI	35
<i>Primarni ishod</i>	35
<i>Sekundarni ishodi</i>	35
HIPOTEZA	36
MATERIJALI I METODE	37
PLAN ISTRAŽIVANJA	37
Ekološka studija	38
Studija slučajeva sa kontrolama	38
Studija molekularne epidemiologije	40
PRIKUPLJANJE I TESTIRANJE BAKTERIJSKIH IZOLATA	40
Prikupljanje uzoraka	40
Testiranje osjetljivosti na antibiotike i detekcija beta-laktamaza proširenog spektra	40

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis).....	42
Detekcija vrste ESBL lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	42
STATISTIČKA ANALIZA	44
Ekološka studija	44
Studija slučajeva s kontrolama	44
Studija molekularne epidemiologije	45
REZULTATI	46
<i>EKOLOŠKA STUDIJA</i>	46
<i>STUDIJA SLUČAJEVA S KONTROLAMA (Case-Control)</i>	55
Analiza čimbenika rizika za infekciju ESBL <i>K.pneumoniae</i> i <i>E.coli</i>	69
<i>STUDIJA MOLEKULARNE EPIDEMIOLOGIJE</i>	71
Rezistencija na antibiotike	72
MDR izolati KP i EC ESBL	76
Rezultati PFGE analize	76
Karakterizacija tipa ESBL.....	82
RASPRAVA	85
<i>Rizik primjene antibiotika za razvoj infekcije ESBL sojem KP i EC</i>	88
<i>Epidemiološka povezanost sojeva</i>	94
<i>Rizici neadekvatne empirijske terapije infekcije ESBL sojem KP i EC</i>	96
<i>Ostali rizični faktori</i>	97
<i>Nadzor primjene antibiotika</i>	98
<i>Antibiotici u liječenju ESBL infekcija</i>	101
Karbapenemi	101
Cefalosporini	102
Kombinacija beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze.....	103
Aminoglikozidi	105
Fluorokinoloni	106
Drugi antibiotici.....	106
<i>Ograničenja istraživanja</i>	108
<i>Prednosti istraživanja</i>	109
<i>Predložene mjere u kontroli ESBL infekcija</i>	110
ZAKLJUČAK	112
SAŽETAK	113
SUMMARY	114
LITERATURA:	115
ŽIVOTOPIS	142
POPIS PUBLIKACIJA	144

UVOD

Problem rezistencije bakterija na antimikrobne lijekove

Rezistencija bakterija potaknuta širokom i učestalom primjenom antimikrobnih lijekova, trenutno je jedan od najznačajnijih medicinskih problema koji ima važan utjecaj na ishod liječenja bolesnika kao i na troškova zdravstva troškove. Smatra se da je od oko >2 milijuna hospitalnih infekcija u SAD, oko 50-60% uzrokovano patogenima rezistentnim na antimikrobne lijekove¹. Nadalje, utvrđeno je da je udio neprimjerenog propisivanja antibiotika u bolničkoj sredini oko 50%^{2 3}.

Rezistencija se pojavila zajedno sa prvom primjenom antibiotika u liječenju infekcija, a predstavlja problem ne samo u zdravstvenim ustanovama već i u široj zajednici. To je potvrđeno širenjem izvanbolničkih infekcija meticilin rezistentnim *Staphylococcus aureus*^{4 5} i povećanom prevalencijom rezistentnog *Streptococcus pneumoniae* u izvanbolničkim pneumonijama⁶. Rezistencija na antimikrobne lijekove rezultat je nezaobilaznog evolucijskog pritiska i zbog toga je predvidiva i neizbježna. Pojava rezistencije *Staphylococcus aureus* na vankomicin posljednjih godina predviđena je i očekivana još prije desetljeća⁷. Pogotovo je zabrinjavajuće povećanje rezistencije gram-negativnih bakterija (GNB), budući da se novi lijekovi na području antimikrobne terapije usmjerene GNB ne očekuju u bližem razdoblju. To potvrđuje potrebu daljnje kontrole antimikrobne terapije te potrebu za razvojem novih lijekova koji zadnjih desetljeća bilježi pad⁸.

Iako se klinički učinak infekcija rezistentnim patogenima još proučava, u mnogim studijama rezistencija uzročnika povezana je sa lošijim ishodima^{9 10 11 12}. Povezanost potrošnje antimikrobnih lijekova sa selekcijom rezistentnih bakterija potvrđena je mnogim studijama, međutim još uvijek nedostaju direktni dokazi o stupnju te povezanosti i o različitom potencijalu pojedinih antimikrobnih lijekova ili skupina za selekciju rezistentnih bakterija^{13 14}. Podaci o rezistenciji prate se u mnogim sredinama i potrebno ih je usporediti sa primjenom antimikrobnih lijekova¹⁵. To se posebno odnosi na zatvorene bolničke sredine, gdje je potrošnja antimikrobnih lijekova značajna i raznovrsna. Brojni su čimbenici koji potiču selekciju rezistentnih patogena: produžena primjena antibiotika, smještaj teških bolesnika unutar relativno malih specijaliziranih prostora bolnice, smanjenje broja medicinskih sestara i pomoćnog osoblja, povećan broj kroničnih i akutnih bolesnika koji zahtijevaju produženu hospitalizaciju izvori su infekcije rezistentnim uzročnicima^{16 17 18}. U studijama koje se

bave izučavanjem utjecaja propisivanja antibiotika i selekcije rezistentnih sojeva mora se voditi računa i o prijenosu rezistentnih uzročnika kao uzroku visoke prevalencije rezistentnih sojeva. Potrebno je utvrditi da li se radi o jednom klonu koji se zbog nedovoljnog pridržavanja mjera kontrole i širenja infekcije proširio unutar promatrane jedinice (odjela/bolnice), ili se radi o poliklonalnoj rezistenciji koja je povezana uz selekcijski pritisak primjene antibiotika¹⁹.

U bolnicama se primjena antimikrobnih lijekova obično započinje empirijski do eventualnog dobivanja rezultata mikrobioloških izolata. Pri empirijskom propisivanju antimikrobnih lijekova, liječnici donose odluku temeljenu na znanju o infektivnoj bolesti, kliničkom iskustvu te dostupnim podacima o lokalnoj rezistenciji uzročnika. Smjernice za kontrolu i prevenciju antimikrobne rezistencije preporučaju uvođenje sistema nadzora i brzog izvještavanja o trendovima i značajnim promjenama u rezistenciji bakterija²⁰. Empirijsko propisivanje antimikrobnih lijekova trebalo bi se temeljiti na ovim informacijama, a neke su bolnice uključile sažetak informacija o lokalnoj rezistenciji bakterija na obrasce za naručivanje antibiotika pokušavajući na taj način promicati kvalitetnije empirijsko propisivanje²¹.

Rezistentni gram-pozitivni i gram-negativni patogeni značajan su uzrok hospitalnih infekcija, pogotovo u jedinicama intenzivnog liječenja (JIL). Nadalje, često je ograničen broj antimikrobnih lijekova za liječenje infekcija rezistentnim patogenima, a neadekvatno liječenje bakterijskih infekcija, uz utjecaj na razvoj rezistencije, prihvaćeno je kao važan čimbenik koji ima utjecaja na bolnički mortalitet^{22 23}.

Više je predloženih postupaka u svrhu prevencije selekcije rezistentnih patogena: izolacija bolesnika, praćenje kolonizacije te mjere vezane uz propisivanje antimikrobnih lijekova kao što su: racionalno propisivanje antimikrobnih lijekova, kontrola, izuzeće ili restrikcija propisivanja pojedinih antimikrobnih lijekova, korištenje antimikrobnih lijekova u kombinaciji, te rotacija ili cikličko propisivanje pojedinih antimikrobnih lijekova.

Mnoge su studije pokazale da su promjene u režimu propisivanja antibiotika, kao što su restrikcija pojedinih antibiotika ili ciklička promjena empirijske antimikrobne terapije prvog izbora u određenoj dijagnozi, povezane sa smanjenjem rezistencije na antimikrobne lijekove^{24 25 26 27}. Teoretski, do smanjenja antimikrobne rezistencije dolazi zbog smanjene selekcije rezistentnih sojeva uklanjanjem određenih antibiotika ili skupina antibiotika iz primjene. Učinak primjene pojedinih antimikrobnih lijekova tzv. prve linije na selekciju patogenih uzročnika naročito je vidljiv u JIL, u kojima upravo

tako selekcionirane bakterije postaju značajan uzrok infekcija²⁸. U većini studija zabilježena je veća prevalencija antimikrobne rezistencije u JIL u odnosu na ostale bolničke odjele^{29 30 31 32 33}.

Najučestaliji uzročnici infekcija povezani sa neadekvatnom primjenom antimikrobnih lijekova u JIL su gram-negativne bakterije i *Staphylococcus aureus* [(uz visoku prevalenciju meticilin rezistentnog *S. aureus* (MRSA)]. Zato je bitno primjenjivati strategije koje su usmjerene održavanju učinkovitosti dostupnih antimikrobnih lijekova. Posljednjih godina veliki problem kliničaru i mikrobiologu predstavljaju beta-laktamaze proširenog spektra (engl. *extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL) koje su široko rasprostranjene među enterobakterijama, predominantno u sojevima *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*, KP) i *Escherichia coli* (*E.coli*, EC). Ove beta-laktamaze prenose se plazmidima uz čestu istodobnu prisutnost gena za rezistenciju na fluorokinolone, aminoglikozide i suflonamide, što ograničava izbor lijekova u liječenju infekcija ovim mikroorganizmima.

Beta-laktamaze proširenog spektra

Osnovni mehanizam djelovanja beta-laktamskih antibiotika (penicilina, cefalosporina, karbapenema i monobaktama) je inaktivacija penicillin vežućih proteina (PBP), koji su neophodni u sintezi peptidoglikana bakterijske stanične stijenke. Inhibicija sinteze peptidoglikana dovodi do oslobađanja autolitičkih hidrolaza, što kao posljedicu ima lizu bakterijske stanice³⁴. Do rezistencije na beta-laktamske antibiotike može doći na nekoliko načina: produkcijom beta-laktamaza, promjenom postojećih ili stjecanjem novih PBP-a, smanjenom permeabilnošću staničnog zida i aktivnim efluksom. Najčešći mehanizam rezistencije *E.coli* (EC) i *K.pneumoniae* (KP) na beta-laktamske antibiotike je sinteza beta-laktamaza, a prisutnost beta-laktamaza proširenog spektra u pripadnika obitelji *Enterobacteriaceae*, posebice u KP i EC, od velike je mikrobiološke i kliničke važnosti. Međutim, beta-laktamaze proširenog spektra mogu se naći i u nefermentativnih gram-negativnih bakterija kao što su *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) i *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*)³⁵.

Beta-laktamaze se najčešće klasificiraju prema dvijema shemama (Tablica 1): prema Amblerovoj molekularnoj klasifikaciji i prema Bush-Jacoby-Medeiros funkcionalnom klasifikacijskom sistemu^{36 37}. Sistem klasifikacije prema Ambleru dijeli beta-laktamaze u 4 glavne klase (A, B, C i D). Ova klasifikacija temelji se na homologiji proteina (sličnosti aminokiselina), a ne fenotipskim karakteristikama, tako da su beta-laktamaze

klase A, C i D serinske beta-laktamaze, a B klasa su metalo-beta-laktamaze. Prema Bush-Jacoby-Medeiros klasifikacijskom sistemu, beta-laktamaze su grupirane prema sličnosti supstrata na koje djeluju i inhibicijskom profilu. Ova klasifikacija sastoji se također od 4 glavne grupe i mnoštva podgrupa. Ova je klasifikacija obično korisnija za liječnika kliničara i mikrobiologa u dijagnostičkom laboratoriju.

Nema konsenzusa o preciznoj definiciji ESBL. Najčešće korištena radna definicija je da su **ESBL beta-laktamaze koje su u stanju uzrokovati bakterijsku rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije, i aztreonam (ali ne i cefamicine ili karbapenem) hidrolizom antibiotika, a inhibirane su inhibitorima beta-laktamaza, kao što je klavulanska kiselina.** Prema Bush-Jacoby-Medeiros klasifikaciji radi se o grupi 2be te onim beta-laktamazama grupe 2d koje dijele osnovne karakteristike grupe 2be³⁷.

Oznaka 2b znači da su enzimi potekli iz grupe 2b beta-laktamaza (npr. TEM-1, TEM-2 i SHV); a «e» označava da se radi o beta-laktamazama proširenog spektra (eng. *extended*). Grupa 2b beta-laktamaza hidrolizira penicilin i ampicilin, i u manjoj mjeri karbenicilin i cefalotin. One nisu u stanju hidrolizirati cefalosporine proširenog spektra ili aztreonam. TEM-1 je najčešća plazmidima-prenošena beta-laktamaza ampicilin rezistentnih enteralnih GNB (npr. *E.coli*), dok SHV-1 proizvodi većina *K.pneumoniae*. TEM-2 je manje učestala pripadnica iste grupe sa identičnim biokemijskim značajkama kao TEM-1. ESBL nastale mutacijom od TEM-1, TEM-2 i SHV se razlikuju od svojih progenitora u jednoj jedinoj aminokiselini, što rezultira u značajnoj promjeni enzimske aktivnosti, te one mogu hidrolizirati i treću generaciju cefalosporina i aztreonam.

Sa iznimkom OXA-tipa enzima koji su klasa D enzima, ESBL pripadaju molekularnoj klasi A prema Amblerovoj klasifikaciji. U stanju su hidrolizirati peniciline, cefalosporine uskog spektra i treću generaciju cefalosporina, te monobaktame. ESBL imaju učinkovitost hidrolize ceftazidima, cefotaksima ili aztreonama koja iznosi najmanje 10% u odnosu na hidrolizu benzilpenicilina. ESBL su inhibirane klavulanskom kiselinom, i ta karakteristika ih razlikuje od AmpC-tipa beta laktamaza (grupa 1) koju produciraju organizmi kao *Enterobacter cloacae*, koji također inhibiraju 3. generaciju cefalosporina, ali ih ne inhibira klavulanska kiselina. Općenito, 4. generacija cefalosporina, cefepim, je klinički korisna u liječenju infekcija uzrokovanih organizmima koji produciraju AmpC-tip beta-laktamaza, ali su manje korisni u liječenju infekcija mikroorganizmima koji produciraju ESBL³⁸. Primijećeno je širenje spektra

djelovanja OXA-tipa beta-laktamaza (grupa 2d) prema cefalosporinima proširenog spektra te ih mnogi autori smatraju ESBL³⁹.

Tablica 1. Klasifikacija beta-laktamaza

Klasifikacija

Ambler

klasa A	penicilinaze	TEM, SHV, PC1, CTX-M, SME-1, KPC-1
klasa B	metalo-beta-laktamaze (Zn)	IMP-1, VIM-1, Ccr A
klasa C	cefalosporinaze	AmpC, CMY-2, ACT-1
klasa D	oksacilinaze	OXA-1

Bush-Jacoby-Medeiros

Grupa 1	cefalosporinaze	AmpC, CMY-2, ACT-1, MIR-1
	hidroliziraju cefalosporine proširenog spektra, rezistentni na klavulansku	

kiselinu

Grupa 2	sve su osjetljive na klavulansku kiselinu	
2a	penicilinaze	PCI (<i>Staphylococcus aureus</i>)
2b	penicilinaze širokog spektra	TEM-1, TEM-2, SHV
2be	ESBL	SHV-2, TEM-10, CTX-M
2br	rezistentne na inhibitor	TEM, IRT, TEM-30, TEM-31
2c	hidroliziraju karbenicilin	PSE-1
2d	hidroliziraju oksacilin	OXA-10, OXA-1
2e	cefalosporinaze inhibirane klavul.k.	FEC-1
2f	karbapenemaze	KPC-1, SME-1
Grupa 3	metalo-beta-laktamaze	IMP-1, VIM-1, Ccr A
Grupa 4	razne	

Zbog kliničke i epidemiološke važnosti mnogo je istraživanja posvećeno ESBL. Detalji se mogu naći na web-stranici o nomenklaturi ESBL koju uređuju George Jacoby i Karen Bush (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>).

Porijeklo ESBL

Najčešći mehanizam rezistencije *E.coli* i *Klebsiellae spp.* na beta-laktamske antibiotike jest sinteza beta-laktamaza koje se s obzirom na genetsko porijeklo dijele na kromosomalne i plazmidne. Kromosomalne beta-laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline⁴⁰. One dobro hidroliziraju amino i ureidopeniciline a vrlo slabo cefaloridin, cefalotin i cefoperazon, dok ne djeluju na cefalosporine treće generacije i monobaktame. Neki sojevi *Klebsiellae spp.* pokazuju smanjenu osjetljivost prema

starijim cefalosporinima zbog produkcije plazmidnih TEM ili SHV β -laktamaza kodiranih R plazmidima. One su sintetizirane konstitutivno i osjetljive su na inhibiciju klavulanskom kiselinom. Hidroliziraju karboksi, amino, ureidopeniciline i starije cefalosporine. TEM-1 i TEM-2 su najrasprostranjenije plazmidne β -laktamaze među enterobakterijama općenito a SHV-1 i SHV-2 dominiraju među klebsijelama^{41 42}. SHV-1 je kod *Klebsiellae spp.* kodirana kromosomalno, a uzrokuje rezistenciju na ampicilin i karbencilin dok su TEM-1 TEM-2 povezani s visokim stupnjem rezistencije na peniciline, ali ne na izoksazoil peniciline, i starije cefalosporine. Ti enzimi ne djeluju na cefalosporine širokog spektra. TEM-1 i TEM-2 se razlikuju u samo jednoj aminokiselini, a ne razlikuju se u spektru aktivnosti.

Vremenom je zapažena pojava rezistencije na cefalosporine treće generacije uvjetovana produkcijom β -laktamaza proširenog spektra (ESBL) nastalih mutacijom navedenih TEM i SHV enzima. One se najčešće javljaju u izolatima *K.pneumoniae* i *E. coli*. Rezistencija te vrste predstavlja značajan terapijski problem u mnogim djelovima svijeta.

Mutacija SHV ili TEM enzima mijenja konfiguraciju aktivnog mjesta što širi spektar njihove aktivnosti. Ti enzimi su snažno inhibirani klavulanskom kiselinom i sulbaktamom. Nisu aktivni prema cefamicinima sa α -metoksi supstituentom na poziciji 7 kao što su cefoksitin ili cefotetan⁴³.

Beta-laktamaze proširenog spektra općenito se dijele se u tri skupine: derivate SHV, TEM te one koje ne vuku porijeklo iz TEM ili SHV β -laktamaza.

SHV

U mikrobiološkim bolničkim kliničkim izolatima najčešće se izolira SHV tip ESBL enzima. *Klebsiella ozaenae* sa beta-laktamazom koja je učinkovito hidrolizirala cefotaksim, i u manjoj mjeri ceftazidim, izolirana je 1983. godine¹³⁹. Sekvencioniranje je pokazalo da se ova beta-laktamaza razlikuje od SHV-1 samo u zamjeni glicina serinom na 238 poziciji. Ta mutacija bila je zaslužna za proširenje spektra ove beta-laktamaze koja je nazvana SHV-2. Unutar 15 godina od prvog otkrića SHV-2, mikroorganizmi koji nose ovaj gen nađeni su u svim dijelovima svijeta, ukazujući da je nastanak ove beta-laktamaze bio posljedica selekcijskog pritiska primjene 3. generacije cefalosporina⁴⁴. SHV tip ESBL izoliran je u mnogim mikroorganizmima; *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter spp.*

TEM

TEM-tip ESBL nastale su mutacijama od TEM-1 i TEM-2. TEM-1 je prvi puta opisan 1965. godine u izolatu *E. coli* pacijenta iz Atene, koji se zvao Temoneira (TEM), po kome je dobio i ime⁴⁵. TEM-1 je u stanju hidrolizirati ampicilin u većoj mjeri nego karbenicilin, oksacilin ili cefalotin, a ima zanemarivu aktivnost prema cefalosporinima proširenog spektra. Inhibira ga klavulanska kiselina. TEM-2 ima ista hidrolitičke sposobnosti kao i TEM-1, ali se razlikuje u tome što ima aktivniji nativni promotor i prema vrijednosti izoelektrične točke (5.6 prema 5.4). Prvi puta je opisana 1985.godine, a od TEM-1 razlikuje se u supstituciji glicina lizinom na poziciji 39 polipeptidnog lanca. TEM-13 također je prema hidrolitičkom profilu sličan TEM-1 i TEM-2.

TEM-1, TEM-2 i TEM-13 nisu ESBL. Prva TEM beta-laktamaza s ESBL fenotipom opisana je u *K.pneumoniae* 1988. godine u Francuskoj, a prethodno je 1982. godine opisana *Klebsiella oxytoca* s plazmidom koji je kodirao rezistenciju na ceftazidim⁴⁶. Do sada je otkriveno preko 100 različitih TEM-tip beta-laktamaza, od kojih su većina ESBL. Promjene u aminokiselinama u odnosu na izvorne beta-laktamaze, TEM-1 ili TEM-2, su dokumentirane na <http://www.lahey.org/studies/tametable.htm>.

Otkriveno je mnogo TEM beta-laktamaza sa smanjenim afinitetom za inhibitore beta-laktamaza. Uz vrlo malo iznimki, enzimi TEM tipa koji su manje osjetljivi na učinke inhibitore beta-laktamaza imaju zanemarivu hidrolitičku aktivnost prema cefalosporinima proširenog spektra te se ne smatraju ESBL.

Identificirane su mutante TEM beta-laktamaza koje zadržavaju svojstvo hidrolize treće generacije cefalosporina, no neosjetljive su na inhibiciju inhibitorima beta-laktamaza. One se smatraju kompleksnim mutantama TEM (CMT-1 do -4). U Italiji je identificiran enzim potekao od TEM, TEM-AQ, koji ima izbrisanu jednu aminokiselinu u odnosu na druge TEM-enzime, te nekoliko aminokiselinskih supstitucija⁴⁷.

CTX-M i Toho beta-laktamaze

CTX označava potentnu hidrolitičku aktivnost ovih beta-laktamaza prema cefotaksimu. CTX-M beta-laktamaze pokazuju 40% homologije s TEM i SHV beta-laktamazama. Mikroorganizmi koji produciraju CTX-M-tip beta-laktamaza imaju uobičajenu minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) za cefotaksim koja označava rezistenciju (>64 mcg/ml), dok je MIK za ceftazidim obično u rasponu koji označava osjetljivost (2-8 mcg/ml). Ipak, neke CTX-M tipovi ESBL mogu hidrolizirati i ceftazidim (uz MIK do

256 mcg/ml). Vrijednosti MIK za aztreonam su varijabilne. CTX-M beta-laktamaze učinkovito hidroliziraju i cefepim⁴⁸, a MIK za cefepim u ovih ESBL je viši od primijećenih u bakterija koje produciraju druge tipove beta-laktamaza⁴⁹. Tazobaktam gotovo 10 puta učinkovitije inhibira CTX-M tip beta-laktamaza u odnosu na klavulansku kiselinu⁵⁰. Treba napomenuti da isti mikroorganizmi mogu imati i CTX-M-tip, TEM-tip i SHV-tip ESBL, ili CTX-M-tip ESBL i AmpC-tip beta laktamaza istovremeno, što može mijenjati fenotip rezistancije na antibiotike.

Zadnjih godina u brzom porastu je prevalencija CTX-M-tipa ESBL⁵¹. Do sada su otkriveni na svakom naseljenom kontinentu. Najčešće se izoliraju u tri zemljopisna područja: Južnoj Americi, na Dalekom Istoku i Istočnoj Europi. U Zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi, CTX-M-tip beta-laktamaza do prije par godina nije bio čest. No, u zadnje vrijeme, veći broj autora je izvijestio o pojačanoj prevalenciji CTX-M-tipa ESBL i u ovim područjima. Zbog visoke prevalencije CTX-M-tipa beta-laktamaza u Kini i Indiji, može se reći da se radi o najrasprostranjenijem tipu ESBL na svijetu.

Odnos između potrošnje antibiotika i pojave CTX-M-tipa beta-laktamaza nije dovoljno proučen, iako se povećana prevalencija CTX-M-tipa beta laktamaza u izolatima kod bolesnika sa dijarejom u općoj populaciji, povezuje sa pojačanom dostupnošću cefalosporina izvan bolnica (ceftriakson). Zanimljivo, identične beta-laktamaze su otkrivene u zemljopisno udaljenim područjima (npr. CTX-M-3 je otkriven u Poljskoj i Taiwanu), što upućuje na neovisnu evoluciju ovih enzima⁵². Klonalno širenje CTX-M-tipa beta laktamaza je dobro dokumentirano⁵².

Trenutno najšire rasprostranjen enzim CTX-M u svijetu je CTX-M 15, koji je otkriven u *E. coli* u Indiji 2001⁵³. Multirezistentna *E. coli* koja proizvodi CTX-M-15 javlja se širom svijeta uzrokujući bolničke i izvanbolničke infekcije⁵⁴ u zemljama Europe⁵⁵, Azije⁵⁶, Afrike⁵⁷, Sjeverne i Južne Amerike^{58 59} i Australije⁶⁰.

Prevalencija specifičnih tipova ili grupa CTX-M ESBL zadobila je endemijske razmjere u mnogim zemljama, što uključuje CTX-M-1 enzime u Italiji, CTX-M-9 i CTX-M-14 enzime u Španjolskoj, CTX-M-3 enzime u Poljskoj te CTX-M-15 u Velikoj Britaniji^{61 62}. Općenito je *E. coli* koja proizvodi CTX-M-15 je najčešći tip ESBL u Europi i sve je više opisa ovih izolata izvan bolnice⁶³.

U Indiji više od 70% *E. coli* proizvodi enzime ESBL⁶⁴, a posebno je učestala izolacija CTX-M-15 *E. coli* kako u bolničkoj, tako i u izvanbolničkoj sredini⁶⁵. Može se zaključiti da je Indija vrlo važan rezervoar ovoga mikroorganizma, a putovanje u područje visokog rizika pogoduje njegovom širenju. Velik kapacitet širenja CTX-M-15 *E. coli*

uključuje dva moguća puta: širenje epidemijskog klona (ST 131) sa selektivnim prednostima (višestruka antibakterijska aktivnost i pojačana virulencija) među raznim bolnicama, ustanovama za dugotrajnu njegu; ili horizontalni transfer plazmida ili gena koji nosi *bla*CTX-M-15 alele. Prema literaturnim podacima širenje CTX-M-15 *E. coli* uglavnom je uzrokovano klonom ST 131, ali važan je i plazmidski transfer⁶⁶. Ovaj je klon otkriven u većini Europskih zemalja, uzrokujuću CTX-M-15 pandemiju koja se bilježi danas⁶⁷.

Toho-1 i Toho-2 su beta-laktamaze koje su strukturno slične CTX-M-tipu beta-laktamaza. Kao većina tipova CTX-M beta laktamaza, Toho-1 i Toho-2 enzimi učinkovitije hidroliziraju cefotaksim u odnosu na ceftazidim^{68 69}.

OXA

OXA-tip beta laktamaza dobio je naziv prema sposobnosti hidrolize oksacilina. Ove beta-laktamaze (grupa 2d) karakterizira stupanj hidrolize kloksacilina i oksacilina veći za 50% u odnosu na benzilpenicilin³⁷. Predominantno se nalaze u *Pseudomonas aeruginosa*, ali su nađene i u drugim GNB. Najčešći OXA-tip beta laktamaza, OXA-1 izoliran je u 1-10% *Escherichia coli*⁷⁰.

Većina OXA-tipova beta-laktamaza ne hidroliziraju značajno cefalosporine proširenog spektra i ne smatraju se ESBL. Ipak, OXA-10 hidrolizira (slabo) cefotaksim, ceftriakson, i aztreonam, dajući većini mikroorganizama slabu osjetljivost na navedene antibiotike. Drugi OXA ESBL su OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35 i -45⁷¹. Oni donose rezistenciju na cefotaksim i ponekad na ceftazidim i aztreonam. Simultana produkcija karbapenem-hidrolizirajućih metaloenzima i aztreonam-hidrolizirajućih OXA enzima može dovesti do rezistencije na sve beta-laktamske antibiotike⁷¹.

Evolucija ESBL OXA-tipova beta-laktamaza od ishodišnih enzima sa užim spektrom, ima sličnosti sa evolucijom SHV i TEM-tipa ESBL. Malo je epidemioloških podataka o proširenosti OXA-tipa ESBL.

OXA beta-laktamaze nisu zabilježene u Hrvatskoj.

PER

PER-tip ESBL ima samo oko 25-27% homologije sa poznatim TEM i SHV tipovima ESBL⁷². PER-1 beta-laktamaze učinkovito hidroliziraju peniciline i cefalosporine a inhibira ih klavulanska kiselina. Najviše je izvješća o njegovoj izolaciji iz Turske⁷³, a

nedavno je izoliran i u Italiji, Francuskoj i Belgiji. U Italiji je izoliran *P. aeruginosa* koji producira i PER-1 i karbapenemaze VIM-2⁷⁴. Ova kombinacija enzima donosi organizmu rezistenciju na sve beta-laktamske antibiotike. PER-2 dijeli 86% sličnosti sa PER-1, nađena je do sada samo u Južnoj Americi u vrstama porodice *Enterobacteriaceae* (*S. enterica* serovar *Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *Enterobacter spp.*)⁷². PER beta-laktamaze nisu do sada zabilježene u Hrvatskoj.

VEB-1, BES-1 i druge ESBL

Nedavno su otkrivene različite druge beta-laktamaze koje se prenose plazmidima ili integronima klase A enzima. One nisu nastale pojedinačnim mutacijama (tzv. *single-point*) mutacijom od drugih poznatih beta-laktamaza, i specifične su po svojim zemljopisnim različitostima. Opisane su i nove ESBL koje su kodirane na kromosomima⁷⁵.

VEB-1 imaju najveću homologiju sa PER-1 i PER-2 (38%). One donose rezistenciju visokog stupnja na ceftazidim, cefotaksim i aztreonam, a inhibira ih klavulanska kiselina. Gen koji kodira VEB-1 otkriven je na plazmidu, a takvi plazmidi također prenose rezistenciju na ne-beta-laktamske antibiotike.

BES, BES, TLA, SFO i IBC su drugi primjeri non-TEM, non-SHV ESBL, a otkriveni su na mnogim zemljopisnim lokacijama.

Ove beta-laktamaze nisu opisane u Hrvatskoj.

AmpC beta-laktamaze

Bakterije koje posjeduju AmpC beta-laktamaze rezistentne su na peniciline i cefalosporine, uključujući cefamicine te inhibitore beta-laktamaza⁷⁶. Rezistencija na cefamicine i inhibitore beta-laktamaza razlikuje ih od ESBL. Geni većine AmpC beta-laktamaza nalaze se na kromosomima i obično se nalaze u *Ps. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marscensens* i *Morganella morganii*.

Ekspresija kromosomskih (konstitutivnih) AmpC beta-laktamaza niskog je stupnja bez utjecaja antibiotika.

Dva mehanizma mogu dovesti do povećane produkcije kromosomskih AmpC beta-laktamaza. Jedan način je indukcija u prisutnosti određenih beta-laktamskih antibiotika. Potentni induktori ovih beta-laktamaza su cefoksitin, klavulanska kiselina i imipenem, iako svi cefalosporini mogu inducirati do određenog stupnja produkciju ovih

enzima. U usporedbi s imipenemom, meropenem ima manji induksijski potencijal za AmpC beta-laktamaze. Unatoč činjenici da je potentni induktor, imipenem je stabilan u prisutnosti povišene produkcije AmpC beta-laktamaza, što ga razlikuje od ostalih beta-laktamskih antibiotika. Drugi mehanizam za ekspresiju konstitutivnih AmpC beta-laktamaza je selekcija mutanti sa mutacijom ampD gena koji kodira enzimski represor AmpC. Ove mutante imaju visoku produkciju AmpC beta-laktamaza i u odsutnosti bilo kojeg antibiotika (induktora).

U zadnje vrijeme zabilježene su AmpC beta-laktamaze prenosive na plazmidima (označene su obično kao AmpC-p). Mogućnost kodiranja AmpC beta-laktamaza na mobilnim genetičkim elementima može dovesti do diseminacije rezistencije na antibiotike na različite sojeve mikroorganizama, što je potvrđeno njihovim pronalaskom u mikroorganizmima koji nemaju konstitutivni, kromosomski AmpC gen, Ti mikroorganizmi uključuju *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *E. coli* i *P. mirabilis*. Za razliku od kromosomski kodiranih, AmpC beta-laktamaze kodirane na plazmidima nisu inducibilne. Bakterije koje posjeduju ESBL i AmpC beta-laktamaze predstavljaju veliki izazov i mikrobiologu i kliničaru.

U kombinaciji sa gubitkom porina, mikroorganizmi koji posjeduju AmpC beta-laktamaze rezistentne su i na karbapeneme.

U Hrvatskoj do sada nisu opisane AmpC beta-laktamaze.

Epidemiologija ESBL

Zastupljenost enterobakterija koje proizvode beta-laktamaze proširenog spektra uvelike se razlikuje se s obzirom na zemljopisno područje.

Europa

Mikroorganizmi koji produciraju ESBL prvi put su otkriveni u Europi. Iako su prva izvješća bila iz Njemačke i Engleske, većina izvješća u prvom desetljeću nakon otkrića ESBL bila su iz Francuske. Prvi je val infekcija zabilježen u Francuskoj 1986. godine¹⁴⁰. Do ranih 1990-tih, u Francuskoj je 25-35% bolničkih infekcija bilo uzrokovano *K. pneumoniae* ESBL. No, posljednjih par godina, uz pojačanje intervencija kontrole infekcija, u Francuskoj se prati smanjenje incidencije infekcija sa ESBL *K. pneumoniae*⁷⁷. Važno je također napomenuti, da dok se udio ESBL *K. pneumoniae* izolata smanjuje u nekim dijelovima zapadne Europe, ono je u porastu u Istočnoj Europi⁷⁸.

Praćenja još iz 90-tih godina prošlog stoljeća ukazala su da postoji velika zemljopisna razlika u učestalosti izoliranja ESBL među europskim zemljama, a razlike su također značajne i unutar pojedinih zemalja.

U tablici 2 prikazane su globalne studije koje prate učestalost ESBL bakterijskih izolata a koje uključuju i Europu.

Tablica 2. Učestalost ESBL bakterijskih izolata.

Studija	Godina	Zemlje, N	Centri, N	Ukupna učestalost izolacije ESBL, %	<i>E.coli</i> , %	<i>K.pneumoniae</i> , %	<i>K.oxytoca</i> , %	<i>P.mirabilis</i> , %	Enterobacter spp., %
SENTRY	1997-1998	15	25	4.9	1.3	18.4	12.6	5.3	ND
SMART	2004	9	31		6.4	8.8	ND	ND	11.8
TEST	2004-2006	19	62		7.6	13.3	ND	ND	ND
MYSTIC	2006	12	40	5.6	8.2	9.8	ND	1.4	ND
EARSS	2006	31	oko 800		<1-41	0-91	ND	ND	ND

SMART: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends; TEST: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial; MYSTIC: Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection; EARSS: European Antibiotic Resistance Surveillance System; ND- nedostupni podaci

Sve publicirane studije potvrdile su da je u većini sjevernih europskih zemalja učestalost ESBL izolata niža u usporedbi sa južnim i istočnim europskim zemljama. Postotak ESBL izolata kreće se oko 28% u Bugarskoj, 16% na Cipru, 12% u Portugalu⁷⁹. Program MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) pokazao je značajan porast izolata *E. coli* ESBL u razdoblju od 1997. godine (2,1%) do 2006. godine (8,2%) te porast učestalosti izolacije ESBL među izolatima *K. pneumoniae* (od 9% do 9,8%), a nešto manje među izolatima *Proteus mirabilis* (1,4% izolata u 2006. g.). Prema publikacijama studije MYSTIC u Europi je učestalost ESBL izolata u 2000. g. bila najviša u Rusiji (oko 50%) i Poljskoj (oko 40%)⁸⁰.

Podaci iz TEST studije (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) koji su uključili podatke iz 22 europske zemlje za razdoblje od 2000.-2007. godine, govore o udjelu ESBL u izolatima *K.pneumoniae* od 15.5% te u izolatima *E.coli* od 9.8%, s najvećom učestalošću izolacije ESBL sojeva u Grčkoj, a najmanjom u Danskoj⁸¹.

U studijama praćenja učestalosti izolacije ESBL bakterijskih izolata, jedinice intenzivnog liječenja pokazale su se mjestima povećane prevalencije ESBL sojeva. U jednoj studiji (1997-1998) koja je evaluirala 433 izolata iz 24 jedinice intenzivne skrbi u zapadnoj i južnoj Europi, 25% izolata *K. pneumoniae* produciralo je ESBL⁸². Slična studija prethodno je provedena 1994. godine od istih autora, a na temelju rezultata iz obje studije autori su zaključili da se ukupni udio *Klebsiellae* ESBL nije promijenio, ali je udio intenzivnih jedinica koje su izolirale *Klebsiellu* ESBL porastao sa 74% na >90%^{82 83}. Još je jedna velika studija, koja je uključila više od 100 europskih jedinica intenzivne skrbi, našla različitosti u prevalenciji *Klebsiellae* ESBL; od 3% u Švedskoj do 34% u Portugalu⁸⁴. Studija koja je evaluirala izolate iz jedinica intenzivne skrbi i drugih bolničkih odjela u 25 europske bolnice, našla je da 21% izolata *K.pneumoniae* ima smanjenu osjetljivost na ceftazidim (što je indikativno za ESBL produkciju)⁸⁵. Studija u Turskoj utvrdila je da 58% od 193 mikrobiološka izolata *Klebsiella spp* iz jedinica intenzivne skrbi osam bolnica uključenih u istraživanje producira ESBL⁸⁶.

Ostatak svijeta

U globalnoj studiji temeljenoj na evaluaciji osjetljivosti bolničkih izolata na tigecklin (TEST), udio produkcije ESBL bio je najveći među izolatima *K.pneumoniae* prikupljenima u Latinskoj Americi, potom Aziji/Pacifiku, Europi te Americi (44.0%, 22.4%, 13.3% i 7.5%)⁸⁷. Prema rezultatima studije SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), udio ESBL produkcije u izolatima *E.coli* u Aziji/Pacifiku bio je između 34.9 i 42.2%, a u Indiji i Kini 79% i 54%⁸⁸. Dok je u ovoj studiji dokumentiran peterostruki porast učestalosti *E. coli* ESBL u Europi u razdoblju od 1997. do 2004. godine, u SAD je zamijećen pad s 5,1% na 1,4%⁸⁹, a samo je 4,4% izolata *Klebsiella spp.* u SAD-u 2004. godine produciralo ESBL. No, podaci o učestalosti ESBL bakterijskih izolata u jedinicama intenzivnih skrbi u SAD upućuju na puno veću učestalost ESBL sojeva *K.pneumoniae*, koja je u 2003. godini iznosila 20,3%⁹⁰, što označava porast od 47% u razdoblju od 5 godina⁹¹. Nadalje, procjenjuje se da 8,5%-11% izolata *K. pneumoniae* rezistentnih na ceftazidim u SAD-u proizvode i AmpC β-laktamaze^{92 93}.

U istraživanju provedenom na Novom Zelandu utvrđeno je da je tijekom 2000. godine samo 0,1% izolata *E. coli* i 0% *Klebsiella spp.* iz mokraćnog sustava proizvodilo ESBL⁹⁴. Međutim, od 2001. godine prati se porast učestalosti izolacije ESBL enterobakterija iz godine u godinu te su identificirani bolnički izolati *E. coli* i *K.*

pneumoniae koji proizvode ESBL⁹⁵. Jedna velika bolnica u Aucklandu, Novi Zeland, izvijestila je da je 0,8% izolata *E. coli* i 2,6% izolata *K. pneumoniae* između 2001. i 2004. proizvodilo ESBL, što je označilo sedmerostruki porast u razdoblju od 2001. do 2004. godine⁹⁶. U istraživanju u koje je bilo uključeno 86% novozelandskih bolnica i dijagnostičkih laboratorija u domovima zdravlja tijekom razdoblja od 4 tjedna u 2006. godini, utvrđeno je da je učestalost ESBL *E. coli* među izolatima iz urinarnog trakta porasla s 0,1% na 0,7%, uz još dramatičniji porast učestalosti izolacije *Klebsiella* spp. ESBL na 4,2%⁹⁷. Autori navode da su ESBL enzimi CTX-M, osobito CTX-M-15, dominantni među sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae* koji proizvode ESBL na Novom Zelandu⁹⁷.

Epidemiologija ESBL u Hrvatskoj

U Hrvatskoj su aktivnosti praćenja rezistencije na antibiotike započele 1996. godine osnivanjem Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike pri Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske. Hrvatska se uključila u europske projekte praćenja rezistencije i potrošnje antibiotika (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*; EARSS i *European Surveillance of Antimicrobial Consumption*; ESAC) od 2001. godine, a 2006. godine osnovana je Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA) pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi RH. Hrvatska se ubraja u europske zemlje s visokom potrošnjom antibiotika i posljedično visokim stopama rezistencije na mnoge antibiotike⁹⁸.

Prvo izvješće o *K. pneumoniae* ESBL u Hrvatskoj pojavilo se 1994. godine, sa opisanom prevalencijom ESBL produkcije u *K. pneumoniae* od 9,9%⁹⁹. Većina rezultata o epidemiologiji ESBL odnosi se na područje Zagreba. Do 2000. godine, više od 30% izolata *Klebsiella pneumoniae* iz zagrebačkih bolnica produciralo je ESBL¹⁰⁰. U ovom radu autora iz Zagreba iz 2002. godine objavljeni su rezultati nadzora rezistencije na antimikrobne lijekove provedenog od lipnja do prosinca 1999. godine. U ovo istraživanje uključeni su podaci iz laboratorija 22 bolnice i domova zdravlja. Navodi se rezistencija *E. coli* od 15% na kombinaciju beta-laktamskog antibiotika/inhibitora beta-laktamaze, 24% na kotrimoksazol, 13% na cefuroksim, 4% na ceftazidim, 7% na gentamicin, 5% na ciprofloksacin i 0% na imipenem. U gotovo svim centrima rezistencija na ampicilin bila je oko 40%, a na kotrimoksazol >20%. U jednoj zagrebačkoj bolnici rezistencija na ceftazidim dosegla je 15%, ali je u većini centara iznosila <4%. U ovom istraživanju *Klebsiella* je pokazivala visok stupanj

rezistencije na antibiotike: 34% bilo je rezistentno na koamoksiklav ili ampicilin/sulbaktam, 33% na cefuroksim i 21% na ceftazidim i gentamicin. Opisani organizmi su pokazivali umjerenu rezistenciju (8%-10%) na aminoglikozide (netilmicin i amikacin), ali su općenito pokazivali osjetljivost na ciprofloksacin (rezistencija 6%). Nije zabilježena rezistencija na imipenem. Rezistencija na ceftazidim je iznosila 2%-39%, na gentamicin 2%-44%, a na ciprofloksacin 1%-17%. *E. coli* ESBL je, prema podacima iz 2002. g., bila još uvijek rijetka, osim u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Rebru.

Splitski autori su 2005. godine istraživali učestalost izolacije ESBL *E. coli* i *K. pneumoniae* u kliničkim izolatima bolesnika u KB Split tijekom dvije godine¹⁰¹. Od prikupljenih 6169 kliničkih izolata, 60,5% su činili izolati *E. coli*, a 11,6% *K. pneumoniae*. Od svih izolata *E. coli* 4,7% ih je produciralo ESBL, a od izolata *K. pneumoniae* 36,8%. Učestalost izolacije *K. pneumoniae* ESBL bila je značajnije viša od *E. coli* ESBL. Učestalost ESBL *E. coli* i *K. pneumoniae* izolata bila je najviša na pedijatrijskim odjelima. *E. coli* ESBL bila je značajno više zastupljena u JIL u odnosu prema drugim odjelima. Izolati *E. coli* ESBL pokazivali su značajno veću učestalost rezistencije na aminoglikozide, uključujući amikacin (83,9%) i gentamicin (90,9%) od ESBL negativnih izolata (6,2% i 5,0%). Iako je postotak *E. coli* ESBL rezistentnih na kinolone (1,1%) bio četiri puta manji nego ESBL negativnih sojeva (4,4%), razlika se nije smatrala značajnom. Tijekom 2001. godine nije zabilježen niti jedan *E. coli* ESBL izolat rezistentan na ciprofloksacin, dok su 2002. g. evidentirana dva izolata rezistentna na ciprofloksacin. Niti jedan izolat *E. coli* nije bio rezistentan na karbapeneme. ESBL producirajuća *K. pneumoniae* bila je češće rezistentna na amikacin (58,2%), gentamicin (78,4%), ciprofloksacin (10,6%) i kotrimoksazol (32,1%) u odnosu na ESBL negativne izolate (6,6%, 8,7%, 4,6% i 13,3%).

Prema podacima za našu zemlju iz 2008. godine dobivenih analizom podataka iz 38 centra u Hrvatskoj, udio *E. coli* ESBL je i dalje nizak (3%)¹⁰². Međutim, bilježi se visoka učestalosti izolacije KP ESBL (29%). Velik porast izolata ESBL bilježio se i prethodnih godina (22% u 2006. i 32% u 2007.g.). Iako je u ovom istraživanju izolirano nekoliko izolata *K. pneumoniae* sa smanjenom osjetljivošću na ertapenem koji su poslani na ponovno testiranje, prisutnost karbapenemaza u izolatima KP i EC u Republici Hrvatskoj još nije zabilježena.

Noviji podaci o učestalosti ESBL izolata *K. pneumoniae* u Republici Hrvatskoj objavljeni su 2010.godine¹⁰³. Ova studija uključila je podatke iz 26 laboratorija iz 21

grada u Republici Hrvatskoj od listopada 2006. do siječnja 2007. godine. Učestalost izolacije ESBL *K.pneumoniae* bila je 19,8%. Od svih ESBL izolata, 56% ih je izolirano u bolničkim, a 44% u izvanbolničkim uzorcima. Najčešći tip ESBL bio je CTX-M, koji je izoliran u ukupno 26% izolata; u 22% bolničkih i 30% izvanbolničkih izolata. Niti jedan izolat nije producirao AmpC beta-laktamaze.

Molekularna epidemiologija infekcija sa ESBL producirajućim mikroorganizmima

Mnogo je studija publicirano koristeći metode molekularne tipizacije u proučavanju epidemiologije nozokomijalnih infekcija sa ESBL producirajućim mikroorganizmima¹⁰⁴. Više od 75% od ovih studija istraživalo je infekcije sa *Klebsiellom* ESBL. Predilekcija ESBL za *Klebsiellu* nije do sada u potpunosti objašnjena. Mnogi geni koji kodiraju ESBL nalaze se na velikim plazmidima. I prije otkrića ESBL, veliki plazmidi koji su prenosili multirezistenciju bili su učestaliji u *Klebsiella pneumoniae* u odnosu na *E. coli*⁷⁰. To je moguće objasniti boljim adaptacijskim mogućnostima *K.pneumoniae* na bolničku okolinu. *Klebsiellae* preživljavaju duže od ostalih enteralnih bakterija na rukama i površinama, što pogoduje prijenosu infekcija unutar bolnice¹⁰⁵.

Bolničke infekcije su najveći problem za programe kontrole infekcija. Ove infekcije mogu se pojaviti kao epidemija ili mogu biti endemske. Važno je razlikovati da li su te infekcije uzrokovane istim ili malobrojnim klonovima mikroorganizma tj. da li su monoklonalne ili poliklonalne. To ima važnu posljedicu za programe kontrole infekcija. Ako su infekcije monoklonalne, to upućuje na horizontalni prijenos od pacijenta na pacijenta. Poliklonalne infekcije govore u prilog selekcijskom pritisku primjene antimikrobnih lijekova kao uzroku selekcije rezistentnih sojeva i povećanju prevalencije infekcija takvim mikroorganizmima, iako mogu biti uzrokovane i prijenosom plazmida između različitih sojeva.

Prije razvoja metoda molekularne biologije u procjeni genetičke povezanosti bolničkih mikroorganizama, klonalnost infekcije određivala se fenotipski. Te metode uključuju biotipizaciju te procjenu osjetljivosti na antimikrobne lijekove. No, niti jedan od tih testova nema mogućnost preciznog razlučivanja. Većina istraživača danas koristi molekularne metode u određivanju genetičke sličnosti ESBL producirajućih mikroorganizama. Najviše se koristi PFGE (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*) kromosomalne DNA. Također se koriste multiple varijacije lančane reakcije

polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Budući da se većina ESBL prenosi plazmidima, u epidemiološkim studijama koristi se i analiza plazmida.

U svim studijama koje su se bavile infekcijama *Klebsiellom*, bar je 2 bolesnika bilo kolonizirano ili inficirano genotipski sličnim sojevima, što govori u prilog učestalom prenošenju s jednog bolesnika na drugog. Uz veliki broj infekcija opisana je diseminacija pojedinog klona genotipski identičnog organizma^{106 107}.

Ipak, u mnogim je bolnicama zabilježena složenija epidemiološka slika. Jedno izvješće opisalo je klonalnu diseminaciju najmanje 5 različitih *Klebsiella* ESBL sojeva u istim jedinicama u isto vrijeme¹⁰⁸. Dodatno, pripadnici pojedinog epidemijskog soja mogu nositi različite plazmide (koji nose različite ESBL gene). Nadalje, genotipski različiti sojevi mogu producirati iste ESBL zbog prijenosa plazmida od jednog soja na drugi¹⁰⁸. Unatoč tome što isti tipovi ESBL mogu biti prevalentni u određenoj jedinici bolnice, oni mogu biti preneseni različitim plazmidima¹⁰⁹. To upućuje na neovisnu evoluciju putem učinka antibiotskog selekcijskog pritiska, a može značiti i prijenos plazmida sa mikroorganizma na mikroorganizam.

Jedinice intenzivne skrbi često su epicentar uzročnika koji produciraju ESBL. Opisano je da je više od 40% svih bolničkih ESBL mikroorganizama bilo prenešeno od bolesnika iz jedinica intenzivne skrbi¹¹⁰.

Također je opisano prenošenje genotipski sličnih ESBL od bolnice do bolnice unutar jednog ili različitih gradova, odnosno između različitih zemalja. Iako se ESBL mikroorganizmi mogu i unijeti u jedinice intenzivne skrbi, epidemija infekcija iz intenzivnih jedinica prema drugim odjelima bolnice učestalija je i dobro je dokumentirana. ESBL mikroorganizmi također se mogu javiti i izvan intenzivnih jedinica. Rasadište infekcija sa ESBL mikroorganizmima mogu biti i domovi za starije i nemoćne osobe te ustanove za kroničnu skrb. U ovim ustanovama, također je opisan klonalni prijenos.

Izvorni enzim TEM-tipa ESBL, TEM-1, široko je rasprostranjen i u mnogim drugim mikroorganizmima, dok se SHV-1 tip ESBL učestalije izolira u *K. pneumoniae* u odnosu na druge mikroorganizme. Gotovo sve *Klebsiellae* koje ne produciraju ESBL, imaju kromosomski nosivac SHV-1 beta laktamazu, za razliku od npr. manje od 10% *E. coli* izolata⁷⁰.

Većina ESBL enzima najprije je prepoznata u Europi^{111 112}. ESBL je u Njemačkoj otkrivena 1983. godine u izolatu iz JIL, uočena po neuobičajenoj rezistenciji na

cefotaksim i ceftazidim i nazvana je SHV-2¹¹². Vrlo brzo nakon toga je u Francuskoj 1984. g. izolirana *K. pneumoniae* s jednakim fenotipom i nazvana je TEM-3¹¹². Enzim CTX-M je identificiran 1989. godine gotovo istodobno u Njemačkoj i Argentini, zatim u Francuskoj i Italiji¹¹³. Prethodno je 1986. godine prepoznat u Japanu u *E. coli*. Do kraja 1990-tih u Europi su učestaliji bili tipovi SHV i TEM, no posljednjih godina značajno raste učestalost enzima CTX-M, a većina tih izolata se otkriva u izvanbolničkih bolesnika s infekcijom mokraćnog sustava. Smatra se da je glavni uzrok povećane izolacije ESBL sojeva koje pripadaju porodicama TEM (TEM-24, TEM-4, TEM-52), SHV (SHV5, SHV-12) te CTX-M (CTX-M-9, CTX-M-3, CTX-M-14 ili CTX-M-15) širenje specifičnih klonova ili klonalnih grupa te epidemijskih plazmida unutar bolnica i u izvanbolničkoj sredini¹¹⁴.

U Japanu su CTX-M-laktamaze identificirane 1986¹¹⁵. Danas su mikroorganizmi koji proizvode ove enzime najčešći tip ESBL u većini krajeva svijeta¹¹⁶. Iako enzimi CTX-M pripadaju klasi A Amblerove klasifikacije, oni nisu povezani s drugim ESBL kao tipovi TEM i SHV. CTX-M uključuje više od 80 različitih enzima koji su podijeljeni u 6 skupina i uključuju CTX-M skupine -1, -2, -8, -9, -25 i -45¹¹⁷. Enzimi CTX-M su aktivniji protiv cefotaksima i ceftriaksona nego ceftazidima¹¹⁸. *E. coli* koja proizvodi ove enzime najčešće je odgovorna za izvanbolničke infekcije, iako može izazvati i bolničke, a infekcije izazvane bakterijama koje proizvode enzime TEM i SHV obično izazivaju bolničke infekcije¹¹⁹. Rizični čimbenici za nastanak izvanbolničke infekcije izazvane *E. coli* koja proizvodi CTX-M uključuju ponavljajuće uroinfekte, bolest mokraćnog sustava, prethodno antimikrobno liječenje cefalosporinima ili fluorokinolonima, prethodnu hospitalizaciju, šećernu bolest, bolest jetre te putovanja u zemlje visokog rizika^{120 121}. Predominacija CTX-M enzima ESBL uočena je u mnogim zemljama svijeta¹²², što je dramatičan preokret u odnosu na situaciju 1990-tih kada su TEM i SHV tipovi ESBL bili dominantni, a tipovi CTX-M su tada bili rijetki, osim u Južnoj Americi¹²³. Među tipovima CTX-M čini se da je najčešći CTX-M-15. To je dominantni tip u mnogim studijama u više zemalja, uključujući Australiju, Veliku Britaniju, Francusku, Kanadu i Indiju¹²⁴. U Aziji se uz CTX-M spominje CTX-M-14 kao najčešći tip ESBL¹²⁵.

Kliničko značenje i utjecaj produkcije ESBL beta-laktamaza

Stvaranje beta-laktamaza je najvažniji čimbenik koji doprinosi rezistenciji gram negativnih bakterija na beta-laktamske antibiotike¹²⁶, a opisano je oko 500 različitih

tipova beta laktamaza iz kliničkih izolata^{127 128}. Sve je više razvidno da produkcija ESBL nije važna samo za nozokomijalne infekcije, već postaje važno javnozdravstveno pitanje s obzirom na povećanu prevalenciju infekcija ovim sojevima u izvanbolničkoj populaciji. Dok su *Klebsiella* spp. uglavnom odgovorne za bolničke infekcije, *E. coli* je često uzročnik izvanbolničkih infekcija¹²⁹.

Opisani su različiti načini širenja ESBL sojeva, uključujući klonalno širenje ESBL sojeva, širenje plazmida koji su nosioci ESBL gena te transfer ESBL gena putem integrona. Iz perspektive bolesnika, svi načini predstavljaju akviziciju ESBL iz vanjskog izvora. I diseminacija ESBL gena i mutacije pod utjecajem su selekcijskog pritiska primjene antibiotika¹³⁰, a ta se danas prihvaćena činjenica opisuje kao „kolateralna šteta“ primjene antibiotika¹³¹.

Istraživanja su se bavila povezanošću primjene antibiotika sa selekcijom ESBL sojeva ili na razini skupine (ekološke studije) ili na individualnoj razini (analiza čimbenika rizika), često s proturiječnim rezultatima. Osim mogućih pristranosti specifičnih za pojedini tip istraživanja, bitno je uzeti u obzir da odnos primjene antibiotika i kolonizacije ili infekcije rezistentnim sojem ne mora biti linearan. Naime, ekspozicija antibioticima ne donosi rizik samo za eksponiranog bolesnika, već može povećati i mogućnost kolonizacije ili infekcije bolesnika u okolini eksponiranog bolesnika¹³². Pri tome, sami za sebe, niti izračun regresijskih koeficijenata u ekološkim studijama niti izračuni rizika u studijama na individualnoj razini, ne mogu u potpunosti odraziti utjecaj promjena u potrošnji antibiotika na incidenciju rezistentnih bakterijskih sojeva te je optimalno koristiti oba načina istraživanja istog problema¹³³. Pri tome treba imati na umu da klasične regresijske tehnike ne odražavaju primjereno dinamiku ovog odnosa, tj. vremenski odmak s kojim promjene u potrošnji antibiotika utječu na incidenciju rezistentnih izolata, te se danas predlaže primjena analize vremenskih serija u analizi ovog odnosa¹³⁴.

Većina istraživanja i na individualnoj i ekološkoj razini ukazala je da su cefalosporini proširenog spektra skupina antibiotika najsnažnije povezana sa ESBL produkcijom¹³⁵^{136 137 138}. Uvođenje 3. generacije cefalosporina u kliničku praksu ranih 1980-tih smatrano je velikim uspjehom u borbi protiv beta-laktamazama uzrokovane rezistencije bakterija na antibiotike. Ti su cefalosporini razvijeni kao odgovor na povećanu prevalenciju beta-laktamaza u mikroorganizmima (npr. beta-laktamaze koje hidroliziraju ampicilin u *E. coli* i *K. pneumoniae*) te zbog širenja istih u nove domaćine (npr. *Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae*). Prvo izvješće o plazmidima

prenošenim genima za beta-laktamaze koje su u stanju hidrolizirati cefalosporine proširenog spektra publicirano je 1983. godine¹³⁹. Gen koji je kodirao beta-laktamaze proširenog spektra razlikovao se samo u mutaciji jednog nukleotida u odnosu na gen koji je kodirao SHV-1. Uskoro su otkrivene i druge beta-laktamaze slične TEM-1 i TEM-2, ali proširenog spektra rezistencije^{140 141}.

Posljednjih godina se ESBL progresivno šire diljem svijeta, što se pripisuje velikim dijelom širokoj primjeni cefalosporina 3. generacije u bolničkim uvjetima, no i njihove dostupnosti u izvanbolničkoj sredini (ceftriakson)¹⁴². Studije koje su istraživale rizik primjene kombinacije beta-laktamskih antibiotika sa inhibitorima beta-laktamaza ukazuju da je i ova skupina antibiotika moguće povezana sa povećanom učestalošću izolacije ESBL sojeva KP ili EC, iako su rezultati studija kontradiktorni^{143 144}. S obzirom na poznatu povezanost primjene 3. generacije cefalosporina sa selekcijom rezistentnih bakterija, posljednjih godina značajno je porasla primjena fluorokinolona. Međutim, novije studije povezuju i primjenu flurokinolona sa rizikom od izolacije ESBL sojeva¹⁴³.

Infekcije ESBL enterobakterijama su često povezane s ograničenim terapijskim mogućnostima i lošijim ishodima¹⁴⁵. Problem dodatno pogoršava činjenica da su ESBL sojevi često nosioci gena rezistencije na druge antibiotike, često fluorokinolone, trimetoprim/sulfametoksazol i aminoglikozide¹⁴⁶. Povećanje učestalosti infekcija ESBL sojevima dovodi do povišenja rizika za propisivanje neadekvatne empirijske antimikrobne terapije što je u studiji Tumbarella i suradnika imalo značajan učinak na mortalitet bolesnika liječenih inicijalno neadekvatnom terapijom. U ovoj kohortnoj studiji 21-dnevni mortalitet u grupi neadekvatno liječenih empirijskom antibiotskom terapijom bio je 4 puta viši u odnosu na grupu bolesnika liječenih adekvatnom antibiotskom terapijom (52% vs. 11%)¹⁴⁶. Procijenjeno je da je bakterijemija uzrokovana ESBL sojem *E.coli* povezana sa visokim rizikom neadekvatne inicijalne antimikrobne terapije, produženjem hospitalizacije te povišenim troškovima. Liječenje takvih bolesnika u prosjeku je, prema studiji Tumbarella i suradnika, skuplje za oko 5000 eura¹⁴⁷. Više studija koje su uključile bolesnike sa bakterijemijom uzrokovanom ESBL EC identificiralo je ESBL produkciju u EC kao važan rizičan čimbenik za neadekvatnu inicijalnu antimikrobnu terapiju^{148 149}, što je bio najsnažniji neovisni čimbenik rizik za mortalitet^{150 151}.

Sve je jasnije da produkcija ESBL nije važna samo za bolničke infekcije, već je sve bitniji javnozdravstveni problem uslijed povećanja prevalencije izolacije ESBL sojeva u

izvanbolničkim infekcijama. Izvanbolničke infekcije ESBL sojevima prvenstveno su uzrokovane *E.coli* koja producira CTX-M tip ESBL. Najvećim dijelom se se u izvanbolničkoj sredini radi o infekcijama mokraćnog sustava, iako su opisane i bakterijemije, prvenstveno uzrokovane urinarnom infekcijom ili infekcijom bilijarnog sustava¹⁵². ESBL infekcije u izvanbolničkoj sredini utvrđene su obično u bolesnika sa više opisanih rizičnih čimbenika. Jedna je studija slučajeva s kontrolama identificirala različite rizične faktore za izvanbolničku infekciju *E.coli* ESBL, uključujući stariju dob, ženski spol, dijabetes mellitus, rekurentne infekcije mokraćnog sustava, učestale ambulantne kontrole te prethodnu primjenu aminopenicilina, cefalosporina i fluorokinolona¹⁵³. Novije studije, posebice one provedene u zemljama sa niskom prevalencijom izolacije ESBL sojeva (Švicarska, Kanada, Novi Zeland), naglašavaju i putovanje u zemlje visokog rizika kao važan čimbenik rizika za izolaciju ili infekciju ESBL EC^{154 155 120}. Ovakvi rezultati postavljaju pitanje da li su izvanbolničke ESBL infekcije u stvari infekcije povezane sa zdravstvenom skrbi. Unatoč tome, izvješća o „pravim“ izvanbolničkim ESBL infekcijama sve su češća, uz formiranje i identifikaciju klastera (skupina) slučajeva, posebice unutar članova iste obitelji¹⁵⁶. Zabilježen je veliki broj izvanbolničkih infekcija ESBL producirajućom *E.coli* u bolesnika bez vidljivih čimbenika rizika, što se objašnjava konstantnom povećanju broja zdravih nosilaca koloniziranih sa ESBL EC¹⁵⁷. Ben-Ami i suradnici izvijestili su o čimbenicima rizika za infekciju ESBL EC u 890 izvanbolničkih bolesnika. Značajni čimbenici rizika bili su prethodna antimikrobna terapija, dugotrajan boravak u zdravstvenim ustanovama, nedavna hospitalizacija, dob veća od 65 godina i muški spol¹⁵⁸.

U izvanbolničkoj populaciji se bilježi značajan broj zdravih nosilaca ESBL sojeva u crijevima^{159 160 161}. Potencijalni prijenos ESBL organizama iz životinjskih izvora ljudima putem hranidbenog lanca ili prijenos od bolesnika do bolesnika mogu biti značajni čimbenici u širenju ESBL sojeva izvan bolničke sredine, iako ovo zahtijeva dodatne studije.

Bolničke ESBL infekcije predstavljaju ili klinički značajne infekcije ESBL sojevima iz izvanbolničke sredine, ili infekcije bolničkim ESBL sojevima. Čini se da su udio izvanbolničkih ESBL sojeva u izolaciji ESBL mikroorganizama u bolničkim uvjetima povećava¹⁶². Nadalje, infekcija ili kolonizacija stanovnika mirovnih domova vjerojatno doprinosi širenju ESBL sojeva između zdravstvenih ustanova i izvanbolničke sredine, budući da (za sada limitirani) podaci govore da je incidencija kolonizacije ESBL producirajućim organizmima u stanovnika mirovnih domova u porastu¹⁶³.

Studije bolničkih infekcija uzrokovanih ESBL sojevima odnose se poglavito na *K.pneumoniae*¹⁶⁴. Mnoge su studije koristile studije slučajeva sa kontrolama (engl. *case-control* dizajn) u procjeni rizičnih faktora za kolonizaciju i infekciju sa ESBL producirajućim mikroorganizmima, a opisani klinički sindromi uključuju infekcije respiratornog trakta i infekcije rana te urinarni trakt, bakterijemije i intraabdominalne infekcije^{165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177}. Rizični čimbenici za kolonizaciju ili bolničku infekciju ESBL organizmima slični su onima koji se odnose na druge uobičajene bolničke mikroorganizme, što uključuje produženi boravak u jedinici intenzivne skrbi, teži klinički status, različite tipove katetera, invazivne postupke (urinarni kateter, endotrahealna intubacija, centralna venska linija) ili kirurški zahvat, hemodijalizu, diabetes mellitus, prisutnost nazogastrične sonde, gastrostome ili jejunostome, dekubitale rane, neadekvatnu prehranu te mehaničku ventilaciju^{178 179 180}¹⁸¹. Prethodna primjena antibiotika je u više studija potvrđena kao važan rizični čimbenik za infekciju ESBL sojem, a poglavito se navodi primjena cefalosporina, posebno proširenog spektra, trimetoprima/sulfometoksazola, metronidazola, aminoglikozida, kombinacije beta-laktamskih antibiotika sa inhibitorima beta-laktamaza te fluorokinolona kao rizični čimbenik za ESBL infekciju^{164 182 183 184 154 148}. Epidemiološke studije bolničkih ESBL infekcija često su otkrivale kompleksne uzorke; epidemijski sojevi mogu biti prisutni sa sporadičnima, dok se mogu naći i multipli dominantni klonovi^{185 186}. Nadalje, isti tipovi ESBL enzima mogu se identificirati u klonalno nepovezanim izolatima, ili izolati istog klonalnog podrijetla mogu nositi gene za različite tipove ESBL što se povezuje sa horizontalnim prijenosom ESBL gena mobilnim genetičkim elementima^{187 188}. Klinički utjecaj infekcija povezanih s ESBL producirajućim sojevima najviše je istražen u hospitaliziranih bolesnika, posebice u bolesnika sa bakterijemijom. Utvrđeno je da su bakterijemije uzrokovane enterobakterijama koje poduciraju ESBL u odnosu na ne-ESBL enterobakterije povezane sa kasnijim uvođenjem adekvatne antimikrobne terapije, budući da su empirijski propisani antibiotici često neučinkoviti u liječenju ovih infekcija, a to se smatra i najznačajnijim rizičnim čimbenikom za povišen mortalitet vezan uz ozbiljne infekcije ESLB producirajućim sojevima *K.pneumoniae* ili *E.coli*¹⁸⁹. Liječenje infekcija ESBL producirajućim sojevima *K.pneumoniae* i *E.coli* povezano je, osim sa odgodom u uvođenju adekvatne antibiotiske terapije, s produženim boravkom u bolnici i većom smrtnošću te sa znatno većim troškovima¹⁴⁷.

Liječenje infekcija s ESBL mikroorganizmima

Zbog sposobnosti ESBL mikroorganizama da hidroliziraju mnoge beta-laktamske antibiotike, nije začuđujuće da je izbor antibiotika za liječenje ovih infekcija značajno reduciran. Nedavno izvješće Američkog društva za infektivne bolesti (*Infectious Diseases Society of America*) uključilo je ESBL sojeve *E.coli* i *K.pneumoniae* u popis 6 rezistentnih uzročnika infektivnih bolesti za koje su hitno potrebne nove terapijske mogućnosti¹⁹⁰. Nadalje, plazmidi koji prenose gene koji kodiraju ESBL, često nose i gene koji kodiraju rezistenciju na aminoglikozide, trimetoprim/sulfametoksazol i fluorokinolone. Čak i kada nema plazmidima kodirane rezistencije na kinolone, snažna je povezanost između rezistencije na fluorokinolone i produkcije ESBL. Razlozi za to nisu u potpunosti jasni. U jednoj studiji je 60% mikroorganizama koji su bili rezistentni na ciprofloksacin produciralo i ESBL, u odnosu na 16% u sojeva koji nisu bili rezistentni na ciprofloksacin¹⁹¹.

Martinez Martinez i kolege su pažljivo analizirali mehanizme rezistencije na flurokinolone u kliničkim izolatima *K.pneumoniae*. Opazili su gubitak porinskih kanala samo u onim izolatima *K.pneumoniae* koji su producirali ESBL. Značajan broj tih sojeva također je imao i svojstvo aktivnog efluksa fluorokinolona. No, bez prisutnosti promjena topoizomeraze, gubitak porinskih kanala i aktivni efluks nisu imali značajan učinak na rezistanciju na fluorokinolone. Važno je napomenuti da bolesnici inficirani ESBL mikroorganizmima i mikroorganizmima rezistentnim na fluorokinolone, često dijele povećanu primjenu cefalosporina proširenog spektra i kinolona. Posebice je kod izolata sa CTX-M tipom ESBL česta i korezistencija na kinolone¹⁹².

Antimikrobni lijekovi koji se uobičajeno rabe za empirijsko liječenje ozbiljnih izvanbolničkih infekcija, kao što je 3. generacija cefalosporina, najčešće nisu učinkoviti za sojeve ESBL¹⁹³. Empirijsko antimikrobno liječenje treba biti individualno i zasnovano na osjetljivosti uzročnika lokalne sredine (države, grada, ustanove)¹⁹⁴. Druga činjenica je da čak i izbor antibiotika prema antibiogramu odnosno *in vitro* osjetljivosti bakterije ne jamči uspjeh *in vivo*. Neke studije su primijetile smanjen klinički učinak protiv sojeva ESBL nekih beta-laktamskih antibiotika unatoč njihove osjetljivosti *in vitro*, dok su druge studije pokazale dobar klinički ishod s kombinacijom beta-laktama/inhibitora beta-laktamaze¹⁹⁵. Vjeruje se da je to rezultat tzv. inokulum efekta koji nastaje kada minimalna inhibitorna koncentracija antimikrobnog lijeka raste (tj. antibakterijski lijek gubi aktivnost) s porastom veličine inokuluma (ili broja)

testiranih bakterija. To je opisano za cefalosporine, kombinacije beta-laktama/inhibitora beta-laktamaze (npr. piperacilin/tazobaktam i manje amoksisicilin/klavulanska kiselina)¹⁹⁶ i u manjoj mjeri za fluorokinolone¹⁹⁷.

Kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze obično su učinkovite protiv mikroorganizama koji produciraju ESBL. Međutim, većina mikroorganizama sada producira više tipova ESBL, što smanjuje učinkovitost ovih kombinacija te je opravdanost njihove primjene u ovim infekcijama upitna. *In vitro* rezistencija ESBL izolata na ove kombinacije je u jednoj studiji mikrobioloških izolata iz 35 JIL u Europi, porasla je sa 31% u 1994. godini na 63% u razdoblju od 1997.-1998. godine.

Cefamicini, uključujući cefoksitin i cefotetan, su stabilni na hidrolizu enzimima ESBL i pokazuju osjetljivost. Ipak se ovi lijekovi ne preporučuju zbog mogućnosti razvoja rezistencije tijekom terapije¹⁹⁸.

Karbapenemi *in vitro* imaju najkonzistentniju aktivnost protiv ESBL mikroorganizama te se smatraju antibioticima izbora za ozbiljne infekcije ESBL mikroorganizmima. To podupiru i rezultati brojnih kliničkih studija. Karbapenemi uključujući imipenem, meropenem, doripenem i ertapenem su lijekovi prvog izbora za ozbiljnije infekcije uzrokovane ESBL enterobakterijama. Ovi lijekovi su vrlo stabilni na hidrolizu enzimima ESBL, postižu dobre koncentracije u tjelesnim tkivima i ne pokazuju „učinak inokuluma“¹⁹⁹. Potencijalno negativni aspekti liječenja su visok trošak, parenteralna primjena i potencijalna selekcija rezistentnih sojeva²⁰⁰. Nema za sada dokaza da je kombinacija karbapenema i antibiotika drugih skupina učinkovitija od korištenja samo karbapenema.

Uporaba karbapenema u liječenju infekcija ovim sojevima je u porastu, jer su jedina skupina antibiotika na koje su ovi sojevi bakterija gotovo jednako osjetljivi²⁰¹. No, preširoko empirijsko liječenje kod sumnje na infekciju ESBL sojevima enterobakterija dovodi do porasta rezistencije na karbapeneme drugih mikroorganizama (npr. *P. aeruginosa* i *Acinetobacter calcoaceticus*)^{202 203}, a postoje izvješća i o pojavi rezistencije *E. coli* i *K.pneumoniae* ESBL na karbapeneme²⁰⁴.

Detekcija ESBL i AmpC beta-laktamaza u mikrobiološkom laboratoriju

Metode detekcije ESBL

Mnogi laboratorijski testovi su razvijeni za detekciju ESBL, uključujući *double-disk diffusion*, test mikrodilucije i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), koristeći E Test ili automatske sisteme kao što je Vitek. Molekularni dijagnostički testovi, kao PCR ili izoelektrično fokusiranje, također se koriste sa uspjehom.

Unatoč smjernicama CLSI²⁰⁵ (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), testovi probiranja na ESBL još nisu zadovoljavajući. Problem je da se ESBL razlikuju prema osjetljivosti na specifične cefalosporine 3. generacije, te se odabirom testiranog cefalosporina može utjecati na točnost detekcije pojedinog tipa ESBL.

Prema CLSI treba koristiti probiranje na ESBL i potvrdu ESBL soja u 2 koraka.

Mikroorganizam prvo treba probirati na smanjenu osjetljivost na bilo koji od slijedećih supstrata: cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefpodoksim ili aztreonam, koristeći ili *disk diffusion* metodu ili MIK testiranje. Budući da se senzitivnost disk difuzijske metode ovisi o supstratu, preporuča se korištenje više od 1 od navedenih 5 supstrata. Ako je inicijalni test probiranja pozitivan, radi se fenotipski test potvrde koristeći cefotaksim i ceftazidim, same ili u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom, koristeći ili *disk diffusion* ili test mikrodilucije.

Ako se identificira ESBL, mikroorganizam se smatra rezistentnim na sve peniciline, cefalosporine 1., 2. i 3. generacije i aztreonam, unatoč eventualnim *in vitro* rezultatima koji mogu upućivati na osjetljivost na neki od tih antibiotika.

Međutim, unatoč potvrdnom fenotipskom testu na ESBL, mogu se javiti lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Lažno negativni rezultati fenotipskog testiranja mogu se javiti u ovisnosti o korištenom inokulumu. Opisan je tzv. «učinak inokuluma» koji se sastoji u povećanju MIK-a u ovisnosti o povećanju inokuluma. Uz inokulum u donjem rasponu standarda prema CLSI, u *E.coli* i *K.pneumoniae* sa ESBL tipa TEM, SHV i CTX-M zabilježeni su lažno negativni rezultati. Lažno negativni rezultat također se može javiti u mikroorganizma koji producira ESBL i AmpC beta-laktamaze. U tih sojeva, AmpC beta-laktamaze poništavaju inhibiciju ESBL klavulanskom kiselinom te se maskira produkcija ESBL. Ovaj fenomen je zabrinjavajući s obzirom na to da ne postoje smjernice za detekciju AmpC beta-laktamaza niti ESBL osim za *E.coli*, *K.pneumoniae* i *P.mirabilis*.

U razdoblju od 1998-2004, 8.9% *E.coli* i 20.3% *K.pneumoniae* iz SENTRY Asia-Pacific studije bile su ESBL pozitivne na inicijalnom probiranju, ali negativne tijekom kasnijeg testiranja. U ovom istraživanju nađene su na plazmidima kodirane AmpC beta-laktamaze u 62% ovih izolata *E.coli* i u 75% *Kl. pneumoniae*. Lažno negativni rezultati mogu dovesti do selekcije pogrešnog antibiotika u liječenju infekcije.

Metode detekcije AmpC beta-laktamaza

Ne postoje CLSI smjernice za detekciju AmpC beta-laktamaza, a detekcija AmpC beta-laktamaza još je teže nego detekcija ESBL. Mikroorganizmi koji produciraju AmpC beta-laktamaze ne moraju nužno biti rezistentni na cefalosporine proširenog spektra koristeći konvencionalne koncentracije prema CLSI. Za sada nije potvrđen niti jedan test probiranja niti potvrde produkcije AmpC beta-laktamaza. U odsutnosti istih, mogu se koristiti surogatni markeri koji bi ukazivali na produkciju AmpC-p temeljeno na njihovoj rezistenciji na cefamicine i kombinacije beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza. Rezistencija na cefoksitin u prisutnosti rezistencije na cefalosporine proširenog spektra, upućuje na prisutnost AmpC beta-laktamaza. Nadalje, rezistencija na cefalosporine proširenog spektra, kao npr. ceftazidim, i kombinaciju sa inhibitorom beta-laktamaza, također upućuje na prisutnost AmpC beta-laktamaza. Iako su ovi testovi osjetljivi za detekciju prisutnosti AmpC beta-laktamaza, niti jedna nije specifična, a rezultati su ovisni o vrsti mikroorganizma ili testirane beta-laktamaze. Neki mikroorganizmi imaju povišen MIK za cefoksitin ili kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze. Neovisno o izboru metode probiranja, još nedostaju validirani testovi potvrde.

Tablica 3. Interpretacija antibiograma.

beta-laktamaza	Osjetljivost				Inhib. (osjetljiv)	
	Ceftazidim	Cefotaksim	Cefoksitin	Imipenem	Klavulanska k.	EDTA
ESBL	R	R	S	S	da	ne
AmpC	R	R	S, R	S	ne	ne
Karbapenemaze						
klasa A	R	R	S	R	da, ne	ne
klasa B	R	R	S, R	R	ne	da
klasa D	R	R	S, R	R	ne	ne

Fenotip rezistencije: R- rezistentan, S- senzitan, osjetljiv

Poticaj za istraživanje

U posljednjih 25 godina bilježi se dramatičan porast infekcija rezistentnim gram-negativnim mikroorganizmima, posebice onima koje produciraju ESBL. U svim zemljama u kojima se prati učestalost izolacije ESBL sojeva *E.coli* i *K.pneumoniae*, ona je najveća u JIL. Prema istraživanjima prevalencije ESBL sojeva *E.coli* i *K.pneumoniae* Hrvatska je zemlja sa visokom učestalošću izolacije ESBL sojeva (oko 40% KP ESBL i oko 3% ESBL EC).

Identifikacija ESBL soja označava neosjetljivosti na mnoge beta-laktamske antibiotike, a niti njihova kombinacija sa inhibitorima beta-laktamaza ne smatra se idealnim riješenjem u liječenju infekcija ovim sojevima mikroorganizama. Situaciju otežavaju poteškoće u identifikaciji ESBL soja u prisutnosti konstitutivnih ili plazmidima prenošenih AmpC beta-laktamaza, koje mogu dovesti do propusta u identifikaciji ESBL. Prisutnost ESBL, uz često istovremeno prisutnu rezistenciju na kinolone i aminoglikozide ovih sojeva, zadaje sve veće probleme u planiranju terapije bolesnika zaraženih ovim mikroorganizmima. Neadekvatno antimikrobno liječenje identificirano je kao neovisni čimbenik bolničkog mortaliteta, posebice u infekcijama rezistentnim uzročnicima²⁰⁶. Osim povezanosti sa lošijim ishodom liječenja, liječenje ESBL infekcija povezano je i sa znatno većim troškovima, prema procjenama za oko 5000 eura po bolesniku¹⁴⁷. Nije vjerojatno da će nam u slijedećem desetljeću biti dostupno mnogo novih antimikrobnih lijekova u liječenju ovih infekcija. Poboljšane mjere kontrole infekcije, zajedno sa programima planirane primjene antimikrobnih lijekova, imaju zbog toga važnu ulogu u ograničavanju širenja ESBL mikroorganizama. Nema sumnje da će ESBL postati sve složenije i različitije u budućnosti. To će predstavljati novi izazov za one koji stvaraju kliničke smjernice za detekciju ESBL u kliničkom laboratoriju, kao i one koji stvaraju kliničke smjernice za antimikrobnu terapiju.

Osnova za stvaranje programa spriječavanja širenja ovih infekcija je kombinacija kvalitetnih kliničkih podataka, učinkovitih metoda detekcije i molekularne tipizacije ESBL u mikrobiološkom laboratoriju, preciznog praćenja potrošnje antimikrobnih lijekova te praćenja provedbe metoda kontrole infekcije. Primjena ovih metoda ključna je u kontroli infekcija u JIL, budući da su to mjesta potencijalnog rasapa ovih mikroorganizama u druge dijelove bolnice ili izvan bolnice.

Ono što je u KBC Zagreb do sada uspostavljeno jest samo fenotipska detekcija ESBL u mikrobiološkom laboratoriju. Detekcija prisutnosti AmpC beta-laktamaza ne radi se rutinski niti postoje smjernice za taj postupak. Do sada nije provedeno sustavno praćenje potrošnje antimikrobnih lijekova u sprezi s praćenjem profila antimikrobne rezistencije u ustanovi niti u jedinicama intenzivne skrbi. Prepoznavanje problema infekcija rezistentnim sojevima (u našoj ustanovi prije svega MRSA i ESBL sojevi) na razini je individualnog bolesnika ili odjela, bez evaluacije gore navedenih parametara, uvođenja mjera pojačane kontrole infekcije (osim kontakne izolacije za infekciju sa MRSA), ili promjene preporuka za empirijsku antimikrobnu terapiju u JIL. Također, u Hrvatskoj do sada nije provedeno istraživanje čimbenika rizika za infekciju ESBL sojevima u JIL, niti istraživanje načina i ishoda liječenja ovih infekcija.

Unatoč postojanju liste rezervnih antibiotika na kojoj su cefalosporini 3. i 4. generacije i karbapenemi te aminoglikozidi za JIL, restrikcija njihove primjene je gotovo nepostojeća za JIL. Djelomično zbog saznanja da su infekcije rezistentnim sojevima učestalije u jedinicama intenzivne skrbi, a djelomično zbog nepostojanja podataka na kojima bi se temeljila veća restrikcija. Iste restrikcije postoje za jedinice intenzivne skrbi, kao i za druge odjele bolnice, što je neutemeljeno prema rezultatima studija koje upućuju na različitost spektra uzročnika i njihove rezistencije u JIL u odnosu na druge dijelove bolnice. Primjena fluorokinolona i cefalosporina 1. i 2. generacije u KBC Zagreb nije limitirana.

Iako je primjena cefalosporina 3. generacije u većini studija povezana sa učestalošću izolacije ESBL sojeva, podaci nisu konzistentni za potrošnju fluorokinolona, karbapenema te drugih antibiotika.

CILJ I I HIPOTEZA

CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti lokalne rizične čimbenike za razvoj infekcija sa mikroorganizmima (*Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*) koji proizvode ESBL i AmpC u odabranim JIL u KBC Zagreb u svrhu identifikacije problema te mogućnosti izrade ciljanih smjernica za empirijsku primjenu antimikrobnih lijekova u JIL, a prije svega istražiti važnost primjene antimikrobnih lijekova kao čimbenika rizika za infekciju ESBL i AmpC sojevima *K.pneumoniae* i *E.coli*.

Cilj ove studije je utvrđivanjem kliničke i molekularne epidemiologije infekcija sa ESBL i AmpC sojevima u jedinicama intenzivne skrbi doći do zaključaka koji će omogućiti adekvatnu primjenu antimikrobne terapije i mjera spriječavanja širenja infekcije rezistentnim sojevima u JIL. Nadalje, istodobno sa istraživanjem kliničke i molekularne epidemiologije zasnovane na individualnim podacima o bolesnicima sa ESBL i/ili AmpC infekcijom i njihovim kontrolama, na temelju podataka o ukupnoj potrošnji antibiotika istražiti će se ekološki pritisak primjene antibiotika na pojavnost ovih sojeva u odabranim JIL.

SPECIFIČNI CILJEVI

Primarni ishod

- 1) Evaluacija primjene antibiotika kao čimbenika rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC.
- 2) Evaluacija rizičnih čimbenika:
 - ukupna i prethodna (u odnosu na izolaciju uzročnika) potrošnja antibiotika ukupno, po skupinama i pojedinačno
 - ostale varijable: varijable vezane uz morbiditet, dužinu hospitalizacije u JIL, dana prethodne antimikrobne terapije

Sekundarni ishodi

- 1) Odrediti učestalost KP i EC ESBL producirajućih sojeva u kliničkim izolatima *K.pneumoniae* i *E.coli* u odabranim JIL KBC Rebro.
- 2) Odrediti učestalost KP i EC ESBL MDR sojeva u izolatima *K.pneumoniae* i *E.coli*.

- 3) Procjeniti profil rezistencije KP i EC ESBL sojeva na antibiotike: fluorokinolone, karbapeneme, aminoglikozide, sulfonamide, tetracikline.
- 4) Usporediti PFGE profile K.pneumoniae i E.coli izolata te utvrditi postoji li epidemiološka povezanost izolata
- 5) Odrediti učestalost AmpC producirajućih sojeva u kliničkim izolatima K.pneumoniae i E.coli u odabranim JIL KBC Rebro.
- 6) Odrediti pripadnost KP i EC ESBL porodici TEM, SHV, CTX-M i PER.

HIPOTEZA

- Prethodna primjena antibiotika čimbenik je rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC u istraživanim JIL KBC Zagreb.

MATERIJALI I METODE

PLAN ISTRAŽIVANJA

U svrhu sveobuhvatne identifikacije čimbenika rizika za izolaciju ESBL producirajućih sojeva KP i EC u odabranim JIL KBC Zagreb, ovo istraživanje sastoji se od tri zasebne studije:

1. Ekološka studija utjecaja potrošnje antibiotika izražene kao broj definiranih dnevnih doza (DDD) na 100 bolnoopskrbnih dana (BOD)²⁰⁷ na prevalenciju KP i EC ESBL i AmpC koja je. obuhvatila razdoblje od 1.4.2006.godine do 31.7.2007.godine.
2. Studija slučajeva sa kontrolama (engl.*case-control*) je studija temeljena na individualnim podacima o bolesnicima sa infekcijom s KP ili EC ESBL i kontrolnim slučajevima (bolesnicima sa infekcijom ne-ESBL i ne-AmpC sojem KP ili EC) koja je obuhvatila isto razdoblje.
3. Studija molekularne epidemiologije, koja je obuhvatila PFGE genotipizaciju i karakterizaciju ESBL, a u koju je uključen reprezentativni uzorak izolata KP i EC (ESBL i AmpC te ne-ESBL i ne-AmpC) iz istog razdoblja.

Istraživanje je obuhvatilo 3 JIL: JIL Klinike za internu medicinu, JIL Klinike za neurologiju i JIL Klinike za neurokirurgiju. Iz ovih su se odabranih jedinica intenzivne skrbi na KBC Zagreb- Rebro tijekom razdoblja istraživanja pohranjivali svi nozokomijalni (nakon >2 dana hospitalizacije) mikrobiološki izolati *K. pneumoniae* i *E.coli* iz primarno sterilnih i nesterilnih uzoraka.

Za navedene jedinice intenzivne skrbi također su prikupljeni podaci o broju hospitaliziranih bolesnika, učestalosti izolacije ESBL i AmpC KP i EC i primjeni antimikrobnih lijekova u sklopu ekološke studije te su većim dijelom prospektivno, a djelomično retrospektivno, prikupljeni podatci o karakteristikama bolesnika i infekcija s ne-ESBL i ne-AmpC ili ESBL i AmpC producirajućim izolatima *K.pneumoniae* i *E.coli*. Reprezentativni broj uzoraka ESBL i ne-ESBL sojeva odabran je za studiju molekularne epidemiologije.

Studija je odobrena od Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb. Budući da se ne radi o intervencijskoj studiji, informirani pristanak bolesnika nije bio potreban.

Ekološka studija

Ekološki utjecaj primjene antibiotika na učestalost izolacije ESBL i AmpC sojeva KP i EC istražen je u ekološkoj studiji.

U ovoj studiji se u obradi podataka koristila analiza vremenskih serija (engl. *Distributed Lags Time Series Analysis*) kao specijalizirana tehnika dinamičke regresije koja se primijenjuje u izučavanju povezanosti između varijabli koja uključuje vremenski odmak.

Za studiju utjecaja ukupne potrošnje antibiotika na učestalost izolacije KP i EC ESBL i AmpC prikupljeni su mjesečni podaci o potrošnji svih antibiotika u odabranim JIL. Analizirani su podaci o potrošnji antibiotika po skupinama te pojedinačno. U analizu su uključeni podaci o svim antibioticima a posebna je pažnja usmjerena analizi utjecaja primjene posebnih skupina antibiotika ili pojedinačnim antibioticima, uz koje se prema dostupnim podacima veže povišen rizik od izolacije ESBL i AmpC sojeva KP i EC (3. generacija cefalosporina, fluorokinoloni, aminoglikozidi). Podaci o primjeni antibiotika izraženi su kao DDD/100 BOD.

Podaci o potrošnji antibiotika za izabrane JIL prikupljeni su od Centralne ljekarne KBC Zagreb. Mjesečni podaci o BOD prikupljeni su od administrativne službe KBC Rebro. Mjesečni podaci o učestalosti izolacije KP i EC ESBL i AmpC sojeva u odnosu na ukupni broj izolata EC i KP u izabranim JIL dobiveni su od Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju.

Studija slučajeva sa kontrolama

Povezanost demografskih i kliničkih parametara te primjene antibiotika sa rizikom izolacije KP i EC ESBL soja procijenjena je provedbom studije slučajeva sa kontrolama u koju su bili uključeni bolesnici iz odabranih JIL sa infekcijom ESBL i AmpC sojem (slučajevi) te bolesnici sa infekcijom ne-ESBL i ne-AmpC KP i EC (kontrola). U studiju je ukupno uključeno 32 bolesnika sa ESBL KP ili EC infekcijom (slučajevi) i 64 bolesnika sa ne-ESBL KP ili EC infekcijom (kontrola). AmpC sojevi KP i EC nisu identificirani u ovom istraživanju. Ova studija obuhvatila je razdoblje od 16 mjeseci: od 1.4.2006. do 31.7.2007. U studiju je kao slučaj uključen svaki bolesnik sa znakovima infekcije uz izolaciju ESBL soja KP ili EC u kojih se isti smatrao uzročnikom ili jednim od uzročnika infekcije te za svakog bolesnika iz ESBL skupine po 2 bolesnika (kontrola) iz otprilike istog razdoblja (± 1 mjesec) iz iste JIL, sličnih po

dobi (± 5 godina), u kojih je izoliran običan soj EC ili KP. U studiju su uključeni bolesnici sa kliničkim znacima infekcije u kojih se KP ili EC smatrala uzročnikom ili jednim od uzročnika infekcije. Klinički znaci infekcije uključuju febrilitet, kašalj i zaduha (kod respiratorne infekcije), dizurične tegobe (kod urinarnih infekcija), lokalno crvenilo, toplina (koža i zglobovi), i sl.

Bolničkom infekcijom smatrala se infekcija nastala nakon >48 sati boravka u JIL, a bolničkim izolatom svaki od navedenih izolata izoliran u bolesnika >48 sati od prijema u JIL. Podaci su se prikupljali procjenom bolesnika te upisom podataka s bolničke liste ili iz povijesti bolesti svakog bolesnika uključenog u studiju u pripremljeni upitnik.

Za većinu bolesnika podaci su prikupljeni prospektivno (70%), a nepotpuni podaci za dio uključenih bolesnika (30%) prikupljen je retrospektivno.

Podaci prikupljeni upitnikom su:

- dob, spol
- APACHE II²⁰⁸
- datum prijema; datum premještaja/otpusta/smrti
- vanjski bolesnik, sa drugog odjela, iz druge ustanove
- antibiotska terapija prije prijema u JIL
- tjelesna temperatura, laboratorijski parametri (L, CRP, Na, K, kreatinin), klinički znaci infekcije, rtg ili drugi pokazatelji infekcije
- primarna dijagnoza, mjesto infekcije
- izolat
- antimikrobna terapija
- zahtjev za promjenom empirijske antibiotske terapije nakon dobivanja antibiograma
- primjerenost antimikrobne terapije
- koegzistentna infekcija gram-pozitivnim bakterijama (GPB), rezistentnim GPB, koegzistentna gljivična infekcija
- PRAĆENJE VREMENSKIH INTERVALA:
 - i. vrijeme od prijema do izolacije uzorka
 - ii. trajanje liječenja antibioticima ukupno i do vremena izolacije uzročnika
 - iii. dužina hospitalizacije
- podaci o dosadašnjim bolestima:

- dijabetes mellitus, kronična ili akutna renalna insuficijencija, mehanička ventilacija, HD, maligna bolest, imunosupresivna terapija uključujući kortikosteroidnu terapiju, transfuzija (nakon prijema a prije dijagnoze infekcije), kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB), kardiovaskularna bolest, hipertenzija, bolest jetre, cerebrovaskularna bolest, transplantacija solidnih organa, transplantacija koštane srži, mehanička ventilacija (isključujući postoperativni period <24 sata)

- ishod
- povezanost ishoda sa infekcijom
- primjerenost antimikrobne terapije u odnosu na ishod

Studija molekularne epidemiologije

Studija molekularne epidemiologije provedena je u suradnji sa Kliničkim zavodom za kliničku i molekularnu epidemiologiju KBC Zagreb. Ova studija obuhvatila je PFGE genotipizaciju izolata te karakterizaciju ESBL (SHV, TEM, CTX-M, PER). Izolati su testirani i na produkciju AmpC beta-laktamaza. U ovu studiju uključen je reprezentativni uzorak ESBL (18/39; 46%) i ne-ESBL (127/478); 27%) izolata KP i EC. Svrha ove studije bila je istražiti epidemiološku povezanost izolata te istražiti prevalenciju specifičnih tipova ESBL (SHV, TEM, CTX-M, PER) te prisutnost produkcije AmpC beta-laktamaza u ESBL sojevima.

PRIKUPLJANJE I TESTIRANJE BAKTERIJSKIH IZOLATA

Prikupljanje uzoraka

U studiju su uključeni svi bakterijski izolati: primarno sterilni (hemokultura, likvor, urin) i nesterilni uzorci (bris rane, aspirat traheje, sputum). Svi bakterijski izolati bolesnika sa izolacijom običnog soja ili ESBL i AmpC producirajućeg soja KP i EC u odabranim JIL bili su pohranjeni u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb. Uzorci su pohranjeni u dubokom agaru do početka testiranja. U studiju je uključen po jedan izolat od jednog bolesnika.

Testiranje osjetljivosti na antibiotike i detekcija beta-laktamaza proširenog spektra

Identifikacija izolata temeljila se na morfološkim karakteristikama i korištenju standardnih biokemijskih testova. Nakon identifikacije osjetljivost bakterija na

antimikrobne lijekove odredila se metodom disk-difuzije po Kirby-Baueru na Mueller-Hinton agaru na sljedeće antibiotike (Becton Dickinson, USA): gentamicin (10 μ g), amikacin (30 μ g), netilmicin (30 μ g), ciprofloksacin (5 μ g), norfloksacin (10 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), cefepim (30 μ g), ceftazidim (30 μ g), cefoperazon (75 μ g), piperacilin+tazobactam (100/10 μ g), piperacilin (100 μ g), cefoksitin (30 μ g), cefazolin (30 μ g), cefuroksim (30 μ g) i amoksisilin+klavulanska kiselina (20/10 μ g). Rezultati su interpretirani prema napucima CLSI²⁰⁹.

Prisutnost beta-laktamaza proširenog spektra utvrđena je metodom dvostrukog diska (*double disc-synergy test-DDS*)²¹⁰. Probirni i potvrdni testovi za detekciju ESBL izvedeni su prema važećim standardima CLSI-a. Produkcija ESBL potvrđena je ukoliko je uz dodatak klavulanske kiseline ceftazidimu ili cefotaksimu došlo do smanjenja MIK-a navedenih antibiotika za barem tri dvostruka razrijeđenja.

U svrhu identifikacije AmpC β laktamaze učinjen je fenotipski test cefoksitin diskom prema preporukama CSLI.

Klinički izolati su se nakon gore navedenog testiranja osjetljivosti na antibiotike i na prisutnost beta-laktamaza proširenog spektra (AmpC i ESBL) pohranili do odabira izolata za daljnje uključenje u nastavak istraživanja.

Vitek 2

Svi sojevi uključeni u studiju molekularne epidemiologije (ESBL i ne-ESBL) su ponovno testirani na osjetljivost na antibiotike putem Vitek2 instrumenta uz korištenje VITEK 2 AST-GN30 kartica²¹¹.

Ova kartica namijenjena je za primjenu u VITEK2 instrumentu u svrhu određivanja osjetljivosti klinički značajnih aerobnih gram negativnih bakterija na antibiotike.

Testirana je osjetljivost na slijedeće antibiotike: ampicilin, ampicilin/sulbaktam, piperacilin/sulbaktam, cefazolin, cefoksitin, ceftazidim, ceftriakson, cefepim, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, ciprofloksacin, levofloksacin, nitrofurantoin, trimetoprim/sulfametoksazol. Putem programskog paketa u instrumentu Vitek 2 također je ponovno testiran u svrhu potvrde ESBL i AmpC fenotip.

ESBL MDR definirani su kao ESBL i AmpC sojevi koji su rezistentni i na sve slijedeće antibiotike, odnosno skupine antibiotika: fluorokinolone (norfloksacin, ciprofloksacin), aminoglikozide (gentamicin, netilmicin, amikacin, tobramicin) i trimetoprim/sulfametoksazol.

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)

U svrhu utvrđivanja epidemiološke povezanosti ESBL i AmpC te ne-ESBL i ne-AmpC izolata učinjena je PFGE na reprezentativnom uzorku ESBL i AmpC te ne-ESBL i ne-AmpC izolata KP i EC.

Priprema bakterijske suspenzije i izdvajanje kromosomske DNA učinjena je prema prihvaćenim standardima²¹². Po izdvajanju kromosomske DNA proveden je postupak cijepanja DNA restrikcijskim enzimom, DNA endonukleazom Xba I²¹³. Elektroforeza u gelu pod utjecajem električnog polja izmjeničnog smjera izvedena je u aparatu CHEFF-Dr III system (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD)²¹⁴. Po završetku elektroforeze gelovi su bojeni uranjenjem u otopinu etidij-bromida, vizualizirani pod UV svjetlom uz narančasti filter te fotografirani. Dobivene fotografije su pohranjene za analizu kompjuterskim programom GelCompar (Applied Maths, Ghent, Belgija). Kompjuterski programi potom izračunavaju koeficijente sličnosti između testiranih sojeva, koja se prikazuju u dendogramima.

Sličnost izolata analizirana je kompjuterskim programom Gel Compar u kojem se sličnost svakog para izolata prikazuje dendogramom koji se bazira na Dice koeficijentu uz 3%-tnu toleranciju vrpci i uz parametar optimizacije od 0,5%²¹⁵.

Svi izolati kod kojih je genetska sličnost 80% i veća smatraju se genetski povezanim izolatima, jer upravo ta vrijednost korelira s razlikom u broju i položaju vrpci od 1 do 6²¹⁴.

Detekcija vrste ESBL lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Detekcija SHV, TEM, CTX-M, PER i AmpC beta-laktamazama učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom.

Za detekciju TEM β -laktamaza korišteni su primeri :OT-3 (TIB MOLBIOL) 5- ATG AGTATT CAA CAT TTC CG i OT-4 (TIB MOLBIOL) 5-CCA ATG CTT AAT CAG TGA CG. Za detekciju SHV β -laktamaza korišteni su primeri : SHV-F (TIB MOLBIOL) 5-GCCCGGGTTATTCTTATTTGTTCGC i SHV-R (TIBMOLBIOL) 5-TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA²¹⁶.

PCR-Nhe test korišten je u utvrđivanju razlika između SHV-1 i SHV ESBL beta-laktamaza .

Za detekciju CTX-M β -laktamaza koristeneni su primeri : MA-1 (TIB MOLBIOL) 5- SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA i MA-2 (TIB MOLBIOL) 5- CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG (S=G-C, Y=C-T, R=A-G)²¹⁶ .

Multiplex PCR (CTX-M /grupa 1, 2 i 9) korištena je u određivanju pripadnosti grupama²¹⁶. Za detekciju CTX-M β -laktamaza grupe 1 korišteneni su primeri: M13-U-F (TIB MOLBIOL) 5-GGT-TAA-AAA-ATC-ACT-GCG-TC-3 I M13-L-R(TIB MOLBIOL) 5-TTG-GTG-ACG-ATT-TTA-GCC-GC-3²¹⁶.

Za detekciju CTX-M β -laktamaza grupe 2 koristeneni su primeri:M25-U-F(TIB MOLBIOL) 5-ATG-ATG-ACT-CAG-AGC-ATT-CG-3 I M25-U-R(TIB MOLBIOL) 5-TGG-GTT-ACG-ATT-TTC-GCC-GC-3²¹⁶. Za detekciju CTX-M β -laktamaza grupe 9 koristeneni su primeri: M9-U-F (TIB MOLBIOL) 5-ATG-GTG-ACA-AAG-AGA-GTG-CA-3 I M9-U-R(TIB MOLBIOL) 5-CCC-TTC-GGC-GAT-GAT-TCT-C-3²¹⁶.

Za detekciju PER β -laktamaza koristeneni su primeri.: PER-F (TIB MOLBIOL) 5-GGG ACA RTC SKA TGA ATG TCA- 3 I PER-R (TIB MOLBIOL) 5-GGY SGC TTA GAT AGT GCT GAT-3²¹⁶.

Za detekciju AmpC β -laktamaza koristeneni su primeri : MOXMF (TIB MOLBIOL) 5-GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT-3 I MOXMR (TIB MOLBIOL) 5-CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C-3; CITMF (TIB MOLBIOL) 5-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3 I CITMR (TIB MOLBIOL) 5-TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3; DHAMF (TIB MOLBIOL) 5-CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC-3 I DHAMR (TIB MOLBIOL) 5-CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC-3; ACCMF (TIB MOLBIOL) 5-AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA-3 I ACCMR (TIB MOLBIOL) 5-TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC-3; EBCMF (TIB MOLBIOL) 5-TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG I EBCMR (TIB MOLBIOL) 5-CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT ; FOXMF (TIB MOLBIOL) 5-AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G-3 I FOXMR (TIB MOLBIOL) 5-CAA AGC GCGTAA CCG GAT TGG-3²¹⁷.

Reakcije su izvedene na aparatu GenAmp PCR system 9600. Pročišćavanje PCR produkta učinjeno je primjenom komercijalnog kita QUIAquick PCR purification Kit (Quiagen). Pročišćeni PCR produkt može se skladištiti na -20 °C. Pročišćeni PCR produkt amplificira se uz primjenu ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, koji sadrži dNTP, pufer, polimerazu i označene ddNTP (Applied Biosystems). Dalje se sekvencijski produkt pročišćava upotrebljavajući DyeEx.O Spin

Kit (Qiagen). Dalje slijedi sekvencijska kapilarna elektroforeza koja se izvodi na ABI 3100 Avant Genetic Analyzer aparatu (Applied Biosystems).

Nakon kapilarne sekvencijske reakcije rezultat predstavlja kromatograf, odnosno kromatografska krivulja na kojoj su vidljivi pikovi u četiri različite boje koji predstavljaju po jedan nukleotid. Rezultat u obliku sekvencijskog slijeda moguće je eksportirati u Fasta tekstualnom formatu. Dobivene sekvence unose se u on-line interaktivnu bazu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

STATISTIČKA ANALIZA

Ekološka studija

Inicijalno su se skupni podaci analizirali grafički, analizom vremenskih trendova kreiranjem grafičkih prikaza kretanja potrošnje antibiotika izraženo u DDD/100 BOD i učestalosti izolacije KP/EC ESBL sojeva (% ESBL izolata) po mjesecima tijekom 16 mjeseci.

Budući da je odnos potrošnje antibiotika i razvoja rezistencije dinamički po prirodi, značajnost ove povezanosti evaluirala se primjenom analize vremenskih serija (*Distributed Lags Time Series Analysis*) sa identifikacijom vremenskog razdoblja (kašnjenja) potrebnog da promjene u potrošnji antibiotika pokažu utjecaj na učestalost izolacije ESBL sojeva.

Studija slučajeva s kontrolama

Razlika između ispitivanih grupa (ESBL i ne-ESBL izolati) u odnosu na sve ispitivane varijable od interesa istražila se Man Whitney U testom ili chi- kvadratnim testom u ovisnosti o vrsti varijabli (kontinuirana, kategorička). Kategoričke varijable analizirale su se korištenjem chi-kvadrat testa, a kontinuirane varijable analizirale su se korištenjem Man Whitney U testa. Statistički značajnim smatrala se p-vrijednost <0.05 . Vrijednosti varijabli prikazane su kao srednja vrijednost \pm SD ili kao postotak pripadajuće grupe.

U analizi individualnih podataka osim prethodno navedenih bazičnih statističkih metoda u identifikaciji razlika između skupina (ESBL i ne-ESBL) u varijablama od interesa, koristile su se i dodatne statističke metode evaluacije. Utjecaj čimbenika rizika na izolaciju ESBL soja istražio se metodom logističke regresije za kontinuirane prediktore te analizom 2x2 tablica kontingencije za kategoričke varijable, uz izračun omjera izgleda (engl. „odds ratio“ ili OR; u daljnjem tekstu koristit će se međunarodno

prihvaćena oznaka OR) i pripadajućih 95% intervala pouzdanosti (95% *Confidence Interval*- 95% CI). Izračun omjera izgleda (OR) je statistička metoda koja se koristi da bi se procijenio rizik određenog ishoda ili bolesti (infekcija ESBL sojem) u odnosu na prisutnost određenog čimbenika rizika, tj. OR predstavlja omjer izgleda da se događaj (infekcija ESBL sojem) dogodi u grupi sa čimbenikom rizika u odnosu na izgleda da se isti događaj dogodi u grupi bez čimbenika rizika.

Studija molekularne epidemiologije

Učestalost sojeva osjetljivih/intermedijarno osjetljivih/rezistentnih na pojedine antibiotike te pojedinih tipova ESBL enzima prikazane su kao postotak pripadajuće grupe.

Sve statističke analize učinjene su primjenom softverskog paketa Statistica for Windows, StatSoft, Version 8.

REZULTATI

EKOLOŠKA STUDIJA

Ekološka studija pratila je potrošnju antibiotika u odnosu na učestalost izolata ESBL i AmpC sojeva KP i EC (svi izolati) u razdoblju od 1.4.2006.godine do 31.7.2007.godine. Budući da AmpC sojevi nisu identificirani u ovom istraživanju, u daljnjem tekstu navode se samo ESBL izolati.

U promatranom razdoblju u odabranim JIL najviše su se propisivali penicilini, zatim cefalosporini, karbapenemi, fluorokinoloni, glikopeptidi i aminoglikozidi. U tablici 4 prikazana je potrošnja antimikrobnih lijekova u promatranom razdoblju izražena u DDD/100 BOD. Bilježi se porast potrošnje svih antibiotika izuzev aminoglikozida čija potrošnja je ostala ista 2006.- 2008. (relativni porast potrošnje od 3%). Najveći rast potrošnje u navedenom razdoblju bilježi se za klindamicin, fluorokinolone, 3. generaciju cefalosporina i kombinaciju penicilina s inhibitorima beta-laktamaza (relativni porast potrošnje od 58%, 47%, 43% i 38%).

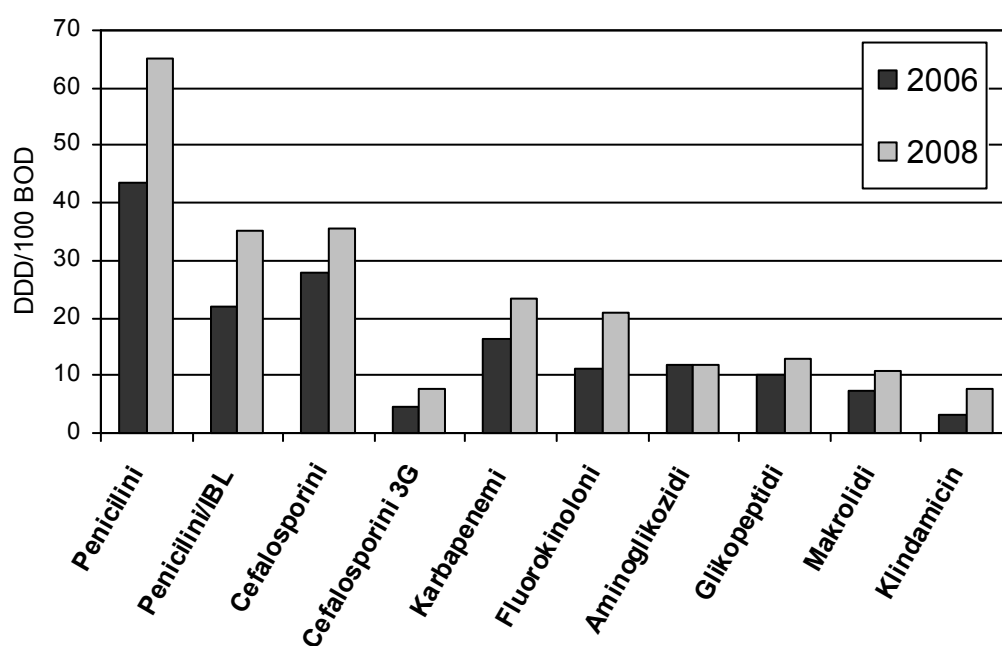
U tablici 4 i slici 1 prikazane su promjene u potrošnji antibiotika u promatranom razdoblju.

Tablica 4. Potrošnja antibiotika u JIL 2006 i2008.

Antibiotici	DDD/100BOD	Relativni porast (%)
Karbapenemi		
2006	16.3	
2008	23.3	29.9
Penicilini		
2006	43.6	
2008	65.1	32.9
Penicilini+inhibitori beta-laktamaze		
2006	21.9	
2008	35.2	37.7
Cefalosporini		
2006	27.7	
2008	35.6	22.3

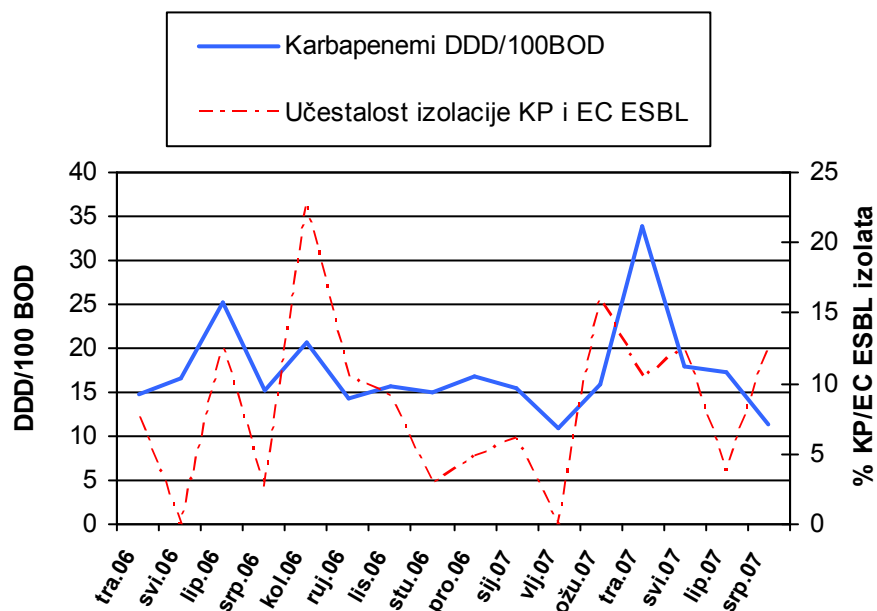
Cefalosporini 3.generacije		
2006	4.4	
2008	7.7	42.7
Fluorokinoloni		
2006	11.1	
2008	20.8	46.6
Aminoglikozidi		
2006	11.7	
2008	11.9	3.0
Makrolidi		
2006	7.2	
2008	10.8	33.2
Glikopeptidi		
2006	10.2	
2008	13.0	22.2
Klindamicin		
2006	3.2	
2008	7.6	58.0

Slika 1. Promjene u potrošnji antibiotika (2006-2008).

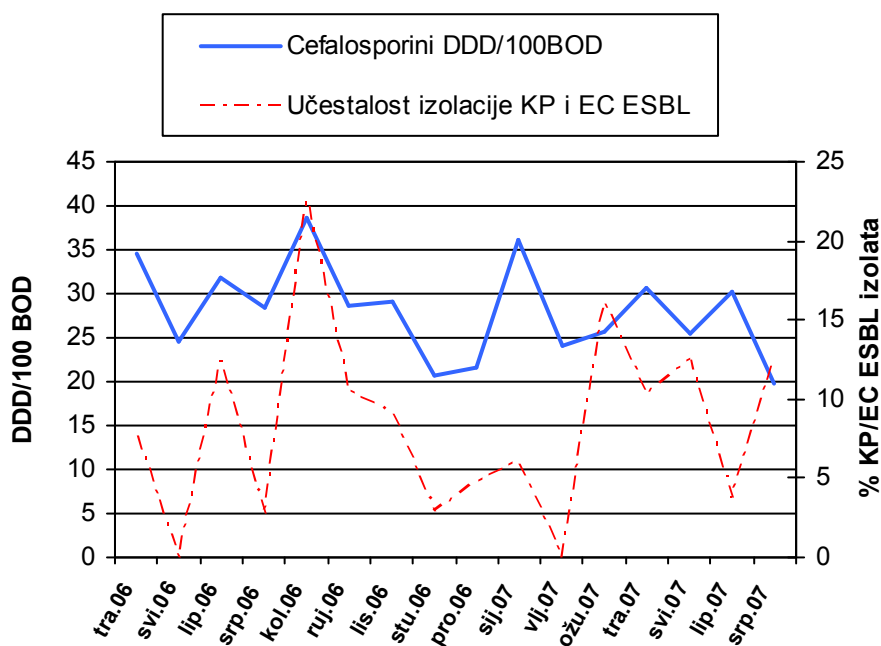


Kretanje mjesečne potrošnje antibiotika, izraženo kao DDD/100 bolnoopskrbnih dana, i kretanje mjesečnog udjela KP i EC ESBL izolata u ukupnom broju izolata KP i EC u promatranom razdoblju prikazano je na slikama 2-13.

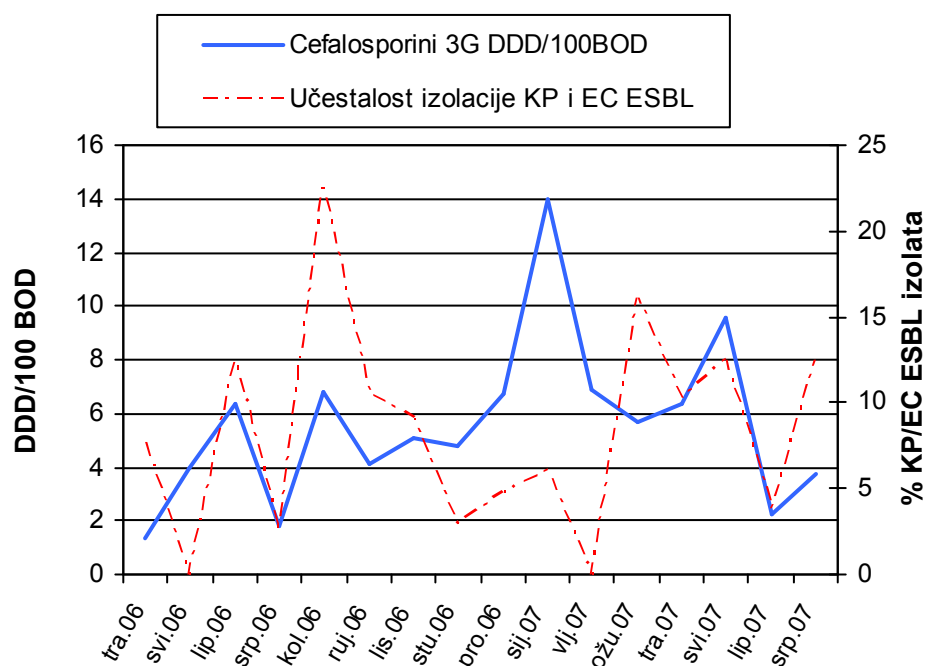
Slika 2. Kretanje potrošnje karbapenema i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



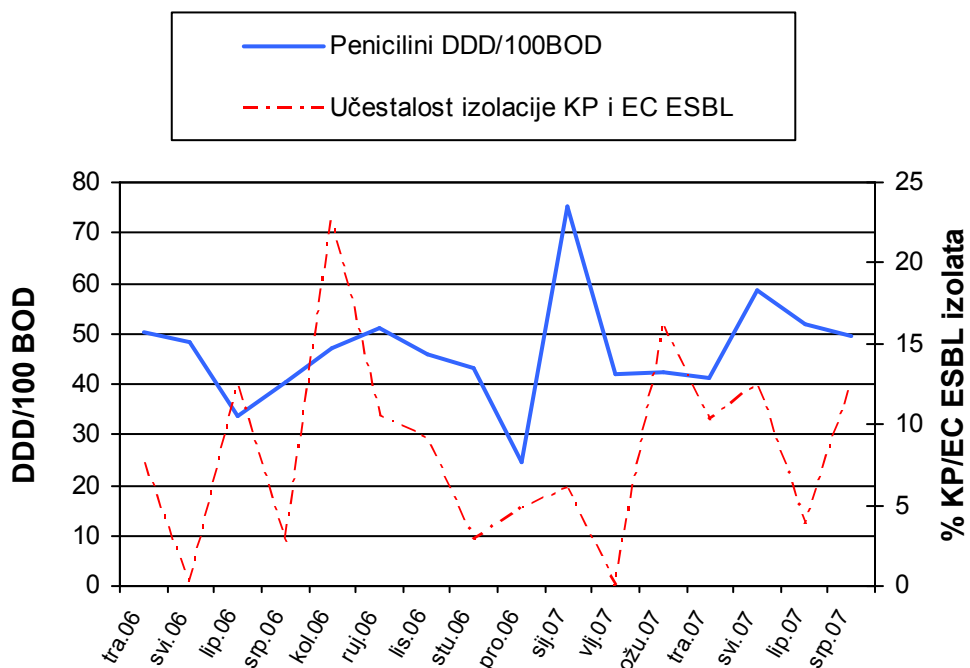
Slika 3. Kretanje potrošnje cefalosporina i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



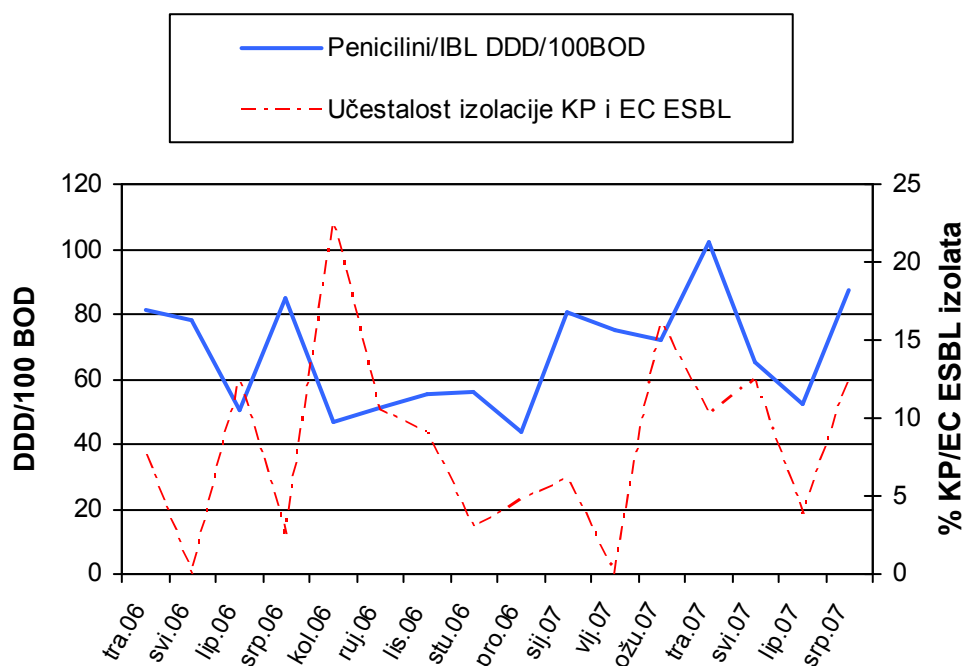
Slika 4. Kretanje potrošnje cefalosporina 3. generacije i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



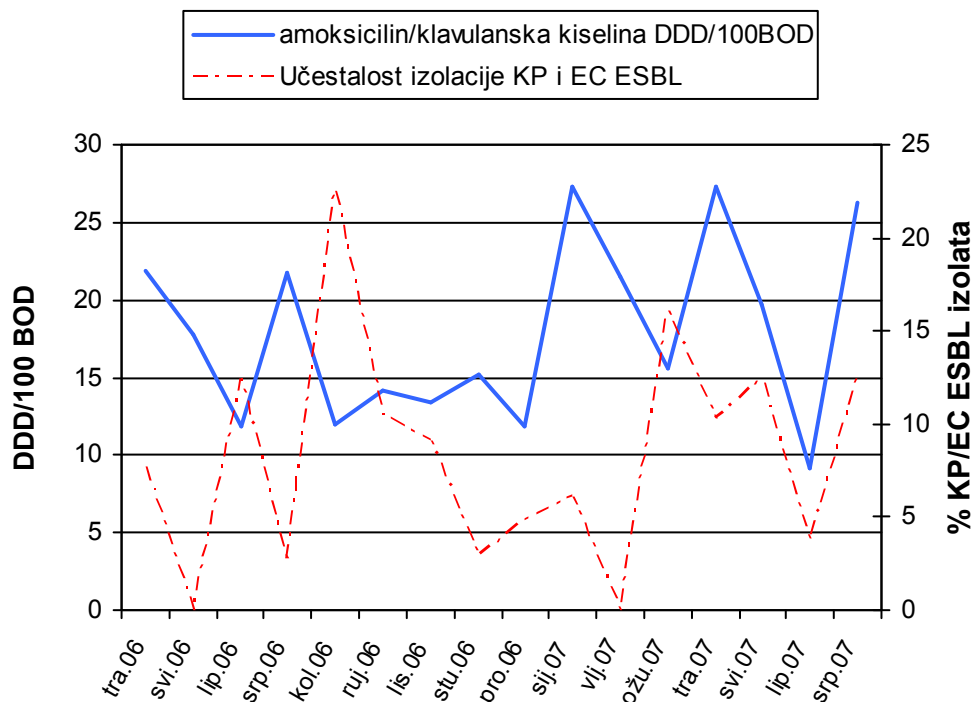
Slika 5. Kretanje potrošnje penicilina i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



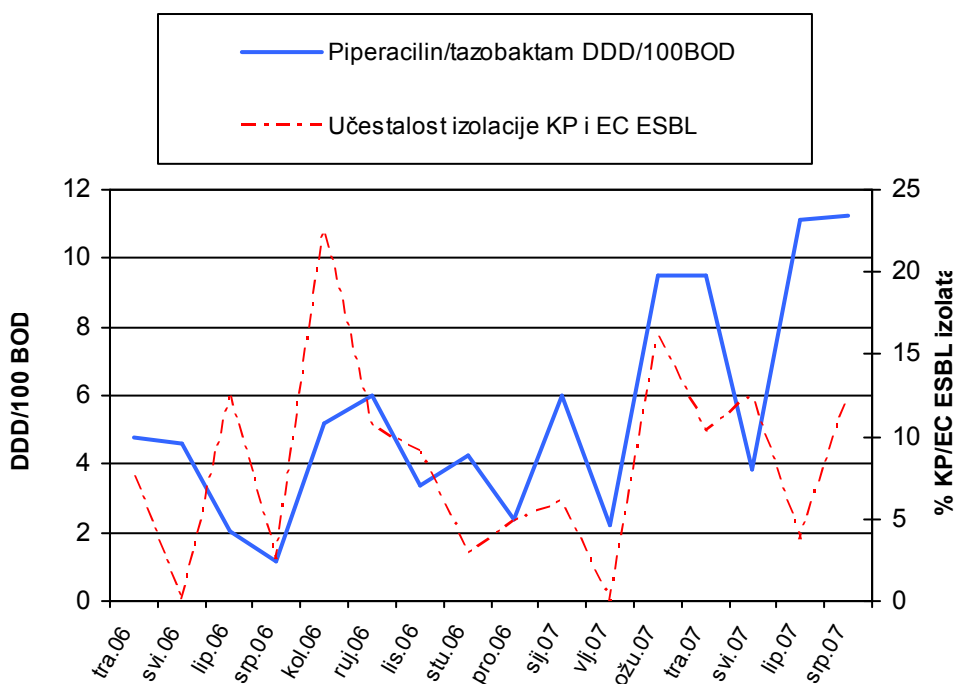
Slika 6. Kretanje potrošnje penicilina/inhibitora beta laktamaze i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



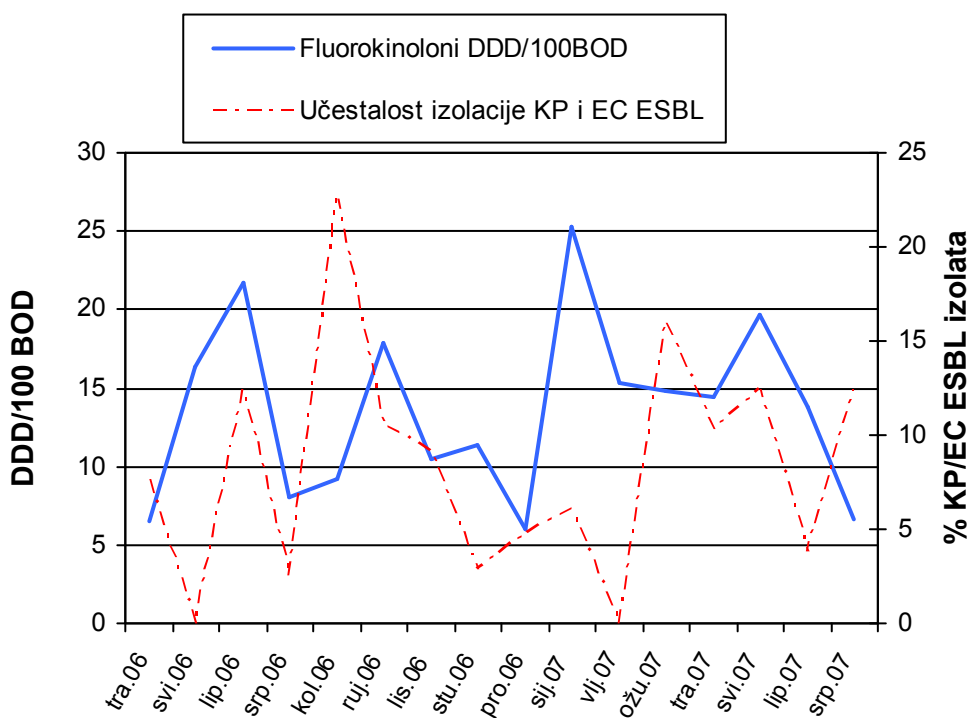
Slika 7. Kretanje potrošnje amoksisicilina/klavulanske kiseline i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



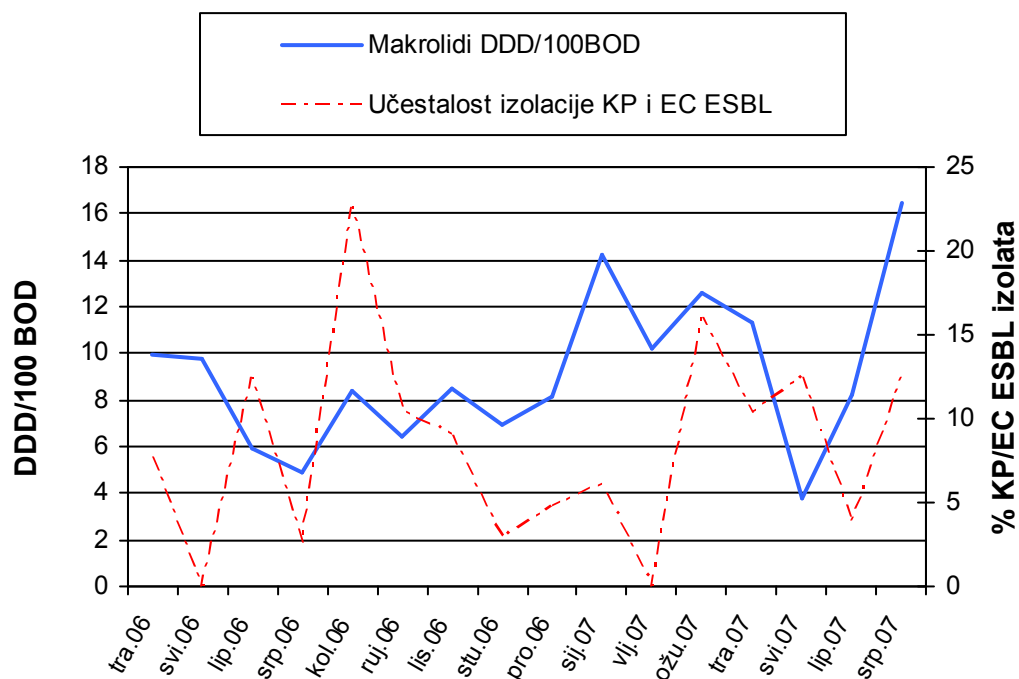
Slika 8. Kretanje potrošnje piperacilina/tazobaktama i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



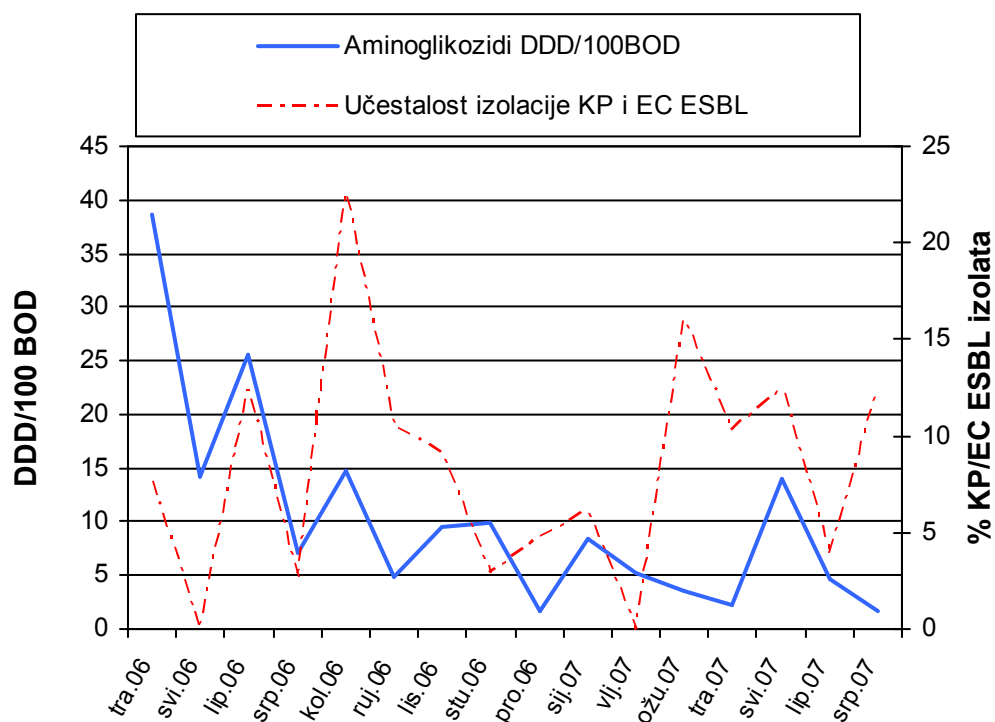
Slika 9. Kretanje potrošnje fluorokinolona i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



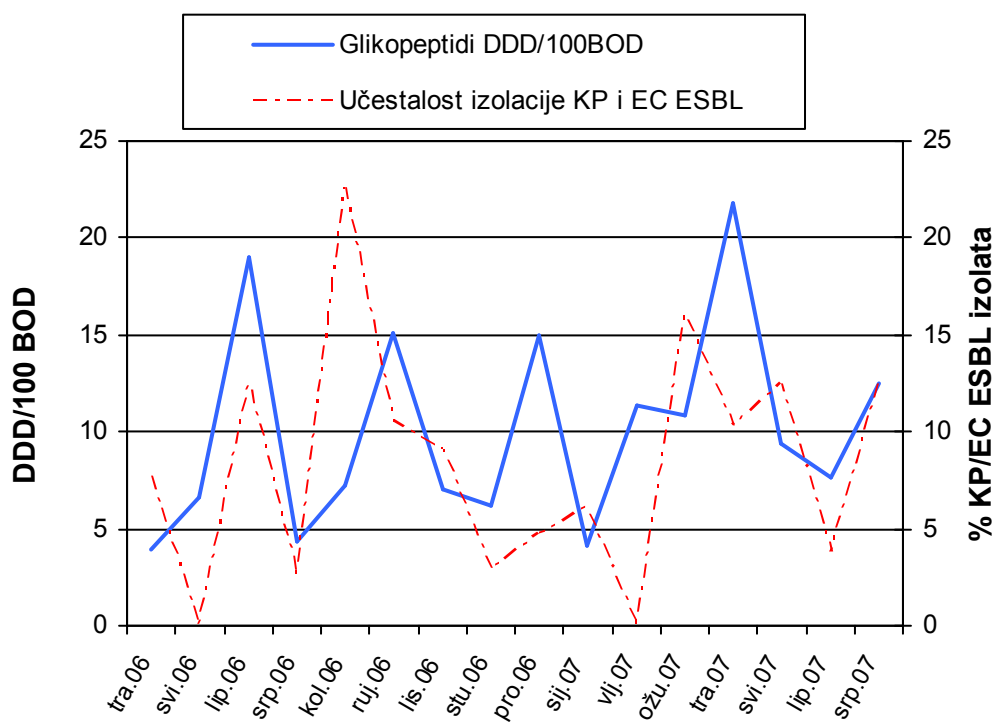
Slika 10. Kretanje potrošnje makrolida i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



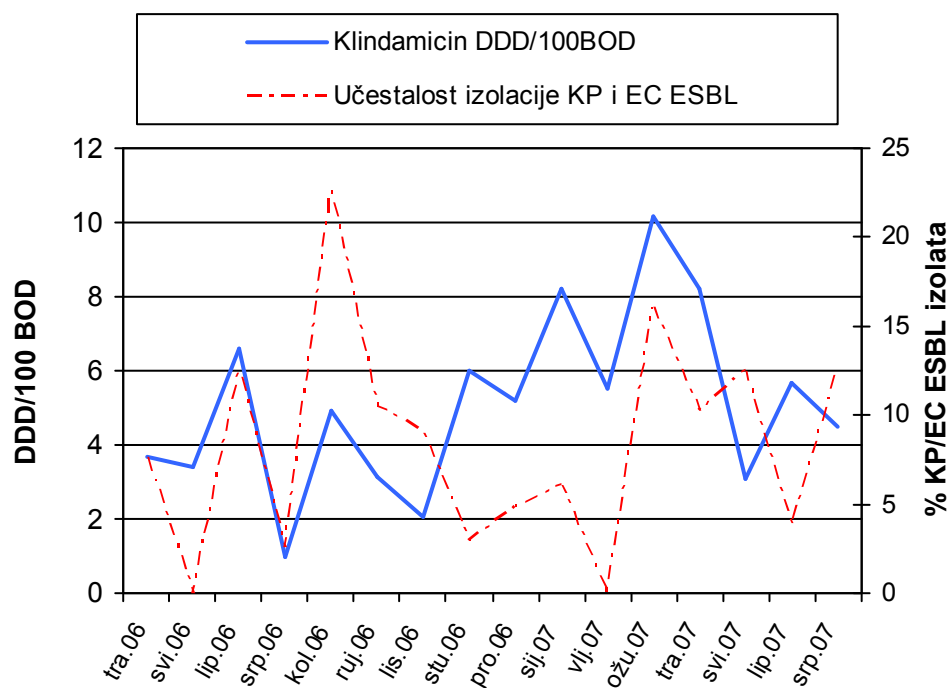
Slika 11. Kretanje potrošnje aminoglikozida i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



Slika 12. Kretanje potrošnje glikopeptida i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



Slika 13. Kretanje potrošnje klindamicina i učestalost izolata ESBL sojeva KP i EC.



Statistička analiza ovih vremenskih serija utvrdila je postojanje značajnog učinka potrošnje fluorokinolona i cefalosporina 3. generacije na učestalost izolata ESBL sojeva sa kašnjenjem od 2 mjeseca. Uočena je i značajna povezanost mjesečne potrošnje cefalosporina ukupno, aminoglikozida, glikopeptida i klindamicina s učestalošću izolata ESBL sojeva Kp i EC. Za učinak ovih antibiotika nije utvrđen vremenski odmak (simultani učinak).

Za aminoglikozide ne može sa potpunom sigurnošću utvrditi je li povećana učestalost izolata ESBL sojeva uzrokovala njihovu potrošnju ili je ona bila posljedica povećane učestalosti izolata ESBL sojeva, budući da se aminoglikozidi mogu primijeniti u liječenju urinarnih ESBL infekcija s osjetljivim sojevima.

Za peniciline, peniciline s inhibitorom beta laktamaze (IBL) i makrolide nije uočena značajna povezanost potrošnje s učestalošću izolata ESBL sojeva KP i EC.

U tablici 5 prikazani su uočeni identificirani značajni vremenski odmaci između promjena u potrošnji antibiotika i promjena u učestalosti izolata ESBL sojeva.

Tablica 5. Analiza vremenskih serija.

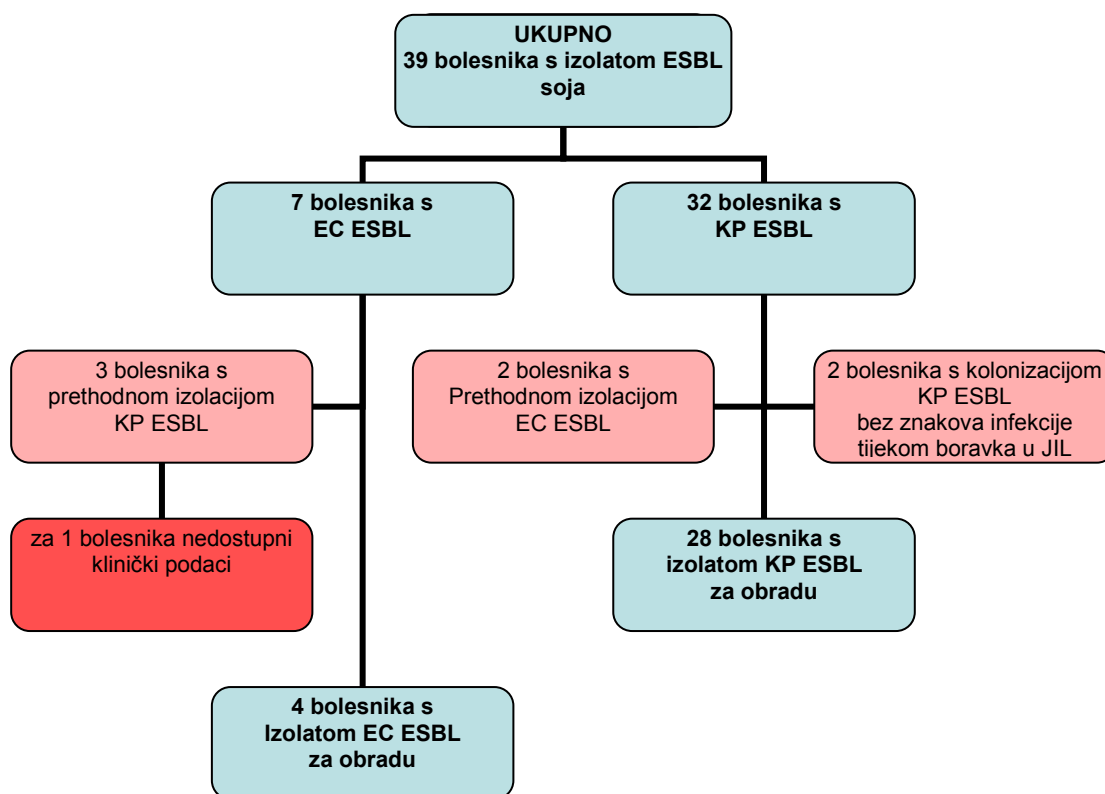
Potrošnja antibiotika (DDD/1000BOD)	Izolacija KP/EC ESBL				
	Koeficijent regresije	Standardna pogreška	t	Kašnjenje u mjesecima (lag) ^a	P vrijednost
Karbapenemi				NZ	
Penicilini				NZ	
Penicilini/IBL				NZ	
Amoksisicilin/klavulanska kiselina				NZ	
Piperacilin/tazobaktam				NZ	
Cefalosporini	0.849	0.195	2.388	0	0.032
Cefalosporini 3G	0.882	0.424	2.852	2	0.015
Fluorokinoloni	0.899	0.022	1.234	2	0.008
Aminoglikozidi	0.731	0.260	3.174	0	0.007
Makrolidi				NZ	
Glikopeptidi	0.821	0.207	2.413	0	0.031
Klindamicin	0.792	0.572	2.336	0	0.036

^anavedeni su samo najznačajniji vremenski odmaci; NZ: neznačajno

STUDIJA SLUČAJEVA S KONTROLAMA (Case-Control)

Ukupno je u razdoblju od 1.4.2006.godine do 31.7.2007.godine u odabranim JIL bilo hospitalizirano 7 bolesnika u kojih je izolirana EC ESBL i 32 bolesnika u kojih je izolirana KP ESBL. AmpC beta-laktamaze nisu identificirane u ovom istraživanju. Ukupno je u 5 bolesnika izolirana u istom boravku i EC ESBL i KP ESBL. Ti bolesnici su uključeni u daljnju analizu samo jednom, kako bi se izbjeglo dupliciranje podataka. Bolesnik je uvršten u grupu EC ESBL ili KP ESBL prema tome koji je od ESBL izolata prvi izoliran, EC ESBL ili KP ESBL. Za jednog od tih 5 bolesnika, osim podataka o izolatu KP i EC ESBL iz mikrobiološkog laboratorija, drugi podatci nisu bili dostupni. Od 32 bolesnika s izolatom KP ESBL, u 2 bolesnika je izolat shvaćen kao kolonizacija te oni također nisu uključeni u analizu. Oni nisu imali znakove infekcije i nisu primali prije niti tijekom hospitalizaciju u JIL antibiotike. Nakon isključivanja duplikata te bolesnika s kolonizacijom, od ukupno 39 bolesnika sa izolatom KP ili EC ESBL, u daljnju analizu uključena su ukupno 32 bolesnika s ESBL izolatom: 4 bolesnika s izolacijom EC ESBL izolatom i 28 bolesnika sa izolacijom KP ESBL (Slika 14).

Slika 14. Prikaz analize bolesnika sa ESBL izolatom.



Svakom bolesniku s ESBL infekcijom pridružene su 2 kontrole. Kriteriji za uključivanje kontrola bili su: približna podudarnost s obzirom na vrijeme uključenja slučaja (bolesnika sa izolatom ESBL soja), JIL i spol. Na kraju je u studiju uključeno ukupno 96 bolesnika: 32 slučaja i 64 kontrole.

U tablici 6 prikazane su kliničke karakteristike slučajeva i kontrola. Uključene grupe bile su usporedive po dobi i spolu.

Većina bolesnika u obje skupine bili su ambulantni bolesnici, 63% slučajeva i 48% kontrola, ostali bolesnici hospitalizirani su u JIL iz druge ustanove ili drugog odjela/klinike KBC Zagreb.

Bolesnici s infekcijom KP ili EC ESBL sojem značajno su bili duže hospitalizirani u JIL u odnosu na bolesnike s infekcijom običnim sojem KP ili EC (27 dana vs 14 dana; $p < 0,001$). Nadalje, hospitalizacija koja je prethodila izolaciji uzročnika bila je značajno duža za slučajeve u odnosu na kontrole (12 dana vs. 5 dana, $p = 0,012$). Također, dužina antibiotske terapije koja je prethodila izolaciji uzročnika bila je značajno veća u bolesnika sa infekcijom ESBL sojem u odnosu kontrole (8 dana vs. 2 dana, $p = 0,002$). Primjena antibiotika prije hospitalizacije zabilježena je u 19% slučajeva te 11% kontrola što nije bila statistički značajna razlika.

Ukupni broj antibiotika primijenjen u liječenju infekcije tijekom boravka u JIL bio je značajno veći u ESBL skupini u odnosu na kontrole (3 dana vs. 2 antibiotika, $p = 0,007$), kao i broj dana antibiotske terapije tijekom boravka u JIL (19 vs 11 dana, $p = 0,005$).

Nije bilo značajnih razlika između slučajeva i kontrola u pridruženim bolestima niti broju intervencija za koje postoji rizik za infekciju u JIL.

Tablica 6. Kliničke karakteristike slučajeva i kontrola.

Karakteristika	ESBL (N=32)	ne-ESBL (N=64)	p-vrijednost
Dob, godine (SD)	62.2 (+20.8)	64.4 (\pm 14.8)	0.760
Žene, n (%)	17 (51.1)	37 (57.8)	0.662
APACHE II, srednja vrijednost \pm SD	17.1 (7.9)	15.9 (6.5)	0.575
Vrsta prijema			0.423
- vanjski bolesnik	20 (62.5)	31 (48.4)	
- s drugog odjela	10 (31.3)	27 (42.2)	
- iz druge ustanove	2 (6.3)	6 (9.4)	

Broj dana hospitalizacije u JIL, dani (SD)	26.8 (±20.4)	13.9 (±12.9)	<0.001
Dužina boravka u JIL prije izolacije uzročnika, dani (SD)	11.9 (±15.2)	5.3 (±7.1)	0.012
Antibiotska terapija prije hospitalizacije u JIL, n (%)	6 (18.8)	7 (10.9)	0.301
Dužina antibiotske terapije prije JIL			0.414
<1 dan	0 (0)	1 (14.3)	
1-2 dana	2 (33.3)	1 (14.3)	
>2 dana	4 (66.7)	5 (71.4)	
Broj antibiotika u JIL, n (SD)	3.2 (±2.3)	2.1 (±1.5)	0.007
Broj dana na antimikrobnoj terapiji u JIL (ukupno), n (SD)	18.9 (±15.2)	11.2 (±12.9)	0.005
Broj dana na antimikrobnoj terapiji prije uzorka, n (SD)	8.2 (±13.3)	2.2 (±4.7)	0.002
Antibiotska terapija prije izolacije uzročnika, n (%)	22 (68.8)	21 (32.8)	<0.001
Drugi mikrobiološki uzorci, n (%)			
Komorbiditet			
dijabetes melitus	7 (21.9)	5 (7.8)	0.057
renalna insuficijencija	11 (34.4)	15 (23.4)	0.261
hemodijaliza	2 (6.3)	4 (6.3)	1.000
kardiovaskularna bolest	8 (25.0)	23 (35.9)	0.274
cerebrovaskularna bolest	17 (53.1)	25 (39.1)	0.191
hipertenzija	16 (50.0)	27 (42.2)	0.468
maligna bolest	9 (28.1)	22 (34.4)	0.534
imunosupresivna terapija (uključujući kortikosteroide)	4 (12.5)	6 (9.4)	0.641
KOPB	1 (3.1)	3 (4.7)	
jetrena lezija	0 (0.0)	4 (6.3)	0.068
Rizični faktori/Intervencije u JIL			
Centralni venski kateter	27 (84.4)	61 (95.3)	0.075
Urinarni kateter	32 (100.0)	61 (95.3)	0.115
Mehanička ventilacija (>24 h)	6 (18.8)	21 (32.8)	0.139
Transfuzija	1 (3.1)	2 (3.1)	1.000

SD- standardna devijacija; APACHE II- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; JIL- jedinica intenzivne skrbi

U tablici 7 prikazani su kriteriji i obilježja infekcije za obje promatrane skupine.

U obje skupine u 90% bolesnika se radilo o bolničkim infekcijama, u što su ubrojene infekcije nastale na drugim bolničkim odjelima ili tijekom boravka u JIL. U ostalih bolesnika izolat je izoliran unutar 48 sati po prijemu u JIL kao vanjskih bolesnika te se infekcija smatrala izvanbolničkom infekcijom. Znaci infekcije bili su prisutni u 25% slučajeva te 22% kontrola već pri prijemu u JIL, kod ostalih bolesnika infekcija se razvila tijekom boravka u JIL. Tijekom boravka u JIL antibiotike su primali svi bolesnici iz skupine slučajeva te 97% kontrola. Dva bolesnika iz kontrolne skupine imala su izolate KP i EC u urinokulturi uz znakove infekcije, no tijekom boravka u JIL nisu im bili propisani antibiotici. Oba su izolata izolirana 2 dana pred otpust iz JIL.

U podjednakom broju slučajeva i kontrola antibiotska terapija infekcije je započeta empirijski (82% vs. 76%). Nije bilo značajnih razlika između slučajeva i kontrola u lokalizaciji infekcije. Najučestalije mjesto infekcije u obje skupine bio je urinarni trakt (72% i 57%). Infekcija je klasificirana kao sepsa i infekcija donjih dišnih puteva u većem broju bolesnika s izolatom ESBL u odnosu na kontrolnu skupinu (19% vs. 6%).

Tablica 7. Karakteristike infekcije.

Karakteristika	ESBL (N=32)	ne-ESBL (N=64)	p-vrijednost
Bolnička infekcija, n (%)	29 (90.6)	56 (87.5)	0.645
Infekcija pri prijemu u JIL, n (%)	8 (25.0)	14 (21.9)	0.732
Primjena antibiotika tijekom hospitalizacije, n (%)	32 (100)	62 (96.9)	0.199
Vrsta antimikrobne terapije			0.544
- empirijska, n (%)	26 (81.3)	47 (75.8)	
- ciljana, n (%)	6 (18.7)	15 (24.2)	
Infekcija GPB, n (%)	8 (25.0)	14 (21.8)	0.732
Infekcija rezistentnim GPB (MRSA), n (%)	4 (12.5)	4 (6.3)	0.516
Gljivična infekcija, n (%)	3 (9.4)	6 (9.4)	1.000
Izolat iz primarno sterilne kulture (HK, likvor) n(%)	7 (21.9)	14 (21.9)	1.000
Drugi izolat, n (%)	30 (93.8)	50 (78.1)	0.038
Tax>37.5 C, n(%)	29 (90.6)	46 (71.9)	0.027
Leukopenija, n(%)	1 (3.1)	3 (4.7)	0.711
L>10, n(%)	7 (21.9)	27 (42.2)	0.044
L>10 + skretanje DKS u lijevo, n(%)	23 (71.9)	35 (54.7)	0.100

CRP>10, n(%)	32 (100.0)	62 (96.9)	0.199
Klinički znakovi infekcije, n(%)	29 (90.6)	47 (73.4)	0.039
Drugi znakovi infekcije (rtg, lab), n(%)	10 (31.3)	23 (35.9)	0.623
Mjesto infekcije			
Sepsa, n(%)	6 (18.8)	4 (6.3)	0.067
Gornji respiratorni trakt, n(%)	1 (3.1)	3 (4.7)	0.712
Donji respiratorni trakt, n(%)	10 (31.3)	33 (51.6)	0.057
Urinarni trakt, n(%)	23 (71.9)	36 (57.1)	0.157
Infekcija kirurške rane, n(%)	0 (0.0)	1 (1.6)	0.366
Intraabdominalna infekcija, n(%)	0 (0.0)	1 (1.56)	0.366
Infekcija vezana uz CVK, n(%)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.136
Infekcija SZS, n(%)	2 (6.3)	4 (6.3)	1.000
Neutvrđeno mjesto infekcije, n(%)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.722

GPB- gram pozitivna bakterija; MRSA- meticilin-rezistentni Staphylococcus aureus; L- leukociti; DKS- diferencijalna krvna slika; CRP- C-reaktivni protein, Tax- tjelesna temperatura mjerena aksilarno

Ukupna primjena antibiotika u bolesnika obje skupine tijekom hospitalizacije u JIL prikazana je u tablici 8, a primjena antibiotika koja je prethodila izolatu uzročnika (ESBL ili ne-ESBL) prikazana je u tablici 9.

Tijekom hospitalizacije u JIL, u ESBL skupini je značajno veća bila primjena karbapenema i aminoglikozida (prvenstveno amikacina) u odnosu na kontrole (56% vs. 13%, $p < 0.001$ i 47% vs. 25%, $p = 0.032$). Ta razlika nije bila značajna kada se u obzir uzela samo primjena karbapenema i aminoglikozida koja je prethodila izolaciji uzročnika (Tablica 9). Također, kada se promatrala ukupna primjena fluorokinolona i azitromicina u skupinama tijekom hospitalizacije u JIL, nije nađeno statistički značajnih razlika. Međutim, između slučajeva i kontrola opažena je značajna razlika primjeni fluorokinolona (19% vs. 5%, $p = 0.031$) te azitromicina (16% vs 2%, $p = 0.009$) koja je prethodila izolaciji uzročnika (Tablica 9). Unatoč tome što nije bilo značajne razlike u prethodnoj primjeni skupine beta-laktamskih antibiotika sa inhibitorima beta-laktamaza između slučajeva i kontrola, prethodna primjena amoksicilina s klavulanskom kiselinom bila je veća u bolesnika sa ESBL infekcijom (19% vs. 6%, $p = 0.06$), iako ova razlika nije statistički značajna.

Tablica 8. Antimikrobna terapija u JIL.

Antimikrobna terapija tijekom boravka u JIL- ukupno	ESBL (N=32)	ne-ESBL (N=64)	p-vrijednost
--	----------------	-------------------	--------------

Karbapenemi, n (%)	18 (56.3)	8 (12.5)	<0.001
Karbapenemi, dužina terapije, dani±SD	8.9 (±3.9)	11.1 (±6.3)	0.461
Meropenem, n (%)	17 (53.1)	7 (10.9)	<0.001
Meropenem, dužina terapije, dani±SD	8.5 (±3.9)	12.4 (±7.7)	0.259
Imipenem/cilastatin, n (%)	2 (6.3)	1 (1.6)	0.213
Imipenem/cilastatin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Penicilini, n (%)	19 (59.4)	26 (40.6)	0.082
Penicilini, dužina terapije, dani±SD	9.5 (±7.8)	10.8 (±9.4)	0.487
Ampicilin/sulbaktam, n (%)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.136
Ampicilin/sulbaktam, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Piperacilin/tazobaktam, n (%)	6 (18.7)	11 (17.2)	0.850
Piperacilin/tazobaktam, dužina terapije, dani±SD	11.5 (±7.3)	16.7 (±8.4)	0.961
Amoksicilin/klavulanska kiselina, n (%)	10 (31.3)	11 (17.2)	0.122
Amoksicilin/klavulanska kiselina, dužina terapije, dani±SD	6.5 (±4.6)	6.7 (±3.9)	0.705
Kristalni penicilin, n (%)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.136
Kristalni penicilin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Kloksacilin, n (%)	4 (12.5)	10 (15.6)	0.679
Kloksacilin, dužina terapije, dani±SD	5.0 (±3.6)	6.8 (±3.6)	0.453
Ampicilin, n (%)	2 (6.3)	0 (0.0)	0.034
Ampicilin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Cefalosporini, n (%)	21 (65.6)	40 (62.5)	0.763
Cefalosporini, dužina terapije, dani±SD	10.9 (±7.6)	7.6 (±4.6)	0.316
Cefazolin, n (%)	0 (0.0)	1 (1.6)	0.366
Cefazolin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Cefuroksim, n (%)	7 (21.9)	9 (14.1)	0.340
Cefuroksim, dužina terapije, dani±SD	8.4 (±5.2)	6.4 (±2.7)	0.536
Cefalosporini 3.generacije, n (%)	3 (9.4)	10 (15.6)	0.386
Cefalosporini 3.generacije, dani±SD	11.0 (±13.0)	7.4 (±5.1)	1.000
Ceftazidim, n (%)	2 (6.3)	3 (4.7)	0.748
Ceftazidim, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Ceftriakson, n (%)	1 (3.1)	7 (10.4)	0.158
Ceftriakson, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Cefepim, n (%)	3 (9.4)	5 (7.8)	0.796
Cefepim, dužina terapije, dani±SD	12.0 (±7.8)	8.8 (±5.1)	
Fluorokinoloni, n (%)	10 (31.3)	18 (28.1)	0.751

Fluorokinoloni, dužina terapije, dani±SD	4.1 (±2.3)	6.1 (±3.8)	0.245
Ciprofloksacin, n (%)	7 (21.9)	15 (23.4)	0.863
Ciprofloksacin, dužina terapije, dani±SD	4.4 (±2.5)	6.6 (±3.7)	0.237
Norfloksacin, n (%)	3 (9.4)	3 (4.7)	0.384
Norfloksacin, dužina terapije, dani±SD	3.3 (±2.1)	3.3 (±3.2)	1.000
Aminoglikozidi, n (%)	15 (46.9)	16 (25.0)	0.032
Aminoglikozidi, dužina terapije, dani±SD	10.4 (±5.0)	8.9 (±5.5)	0.470
Amikacin, n (%)	14 (43.8)	11 (17.2)	0.006
Amikacin, dužina terapije, dani±SD	9.6 (±4.4)	9.5 (±5.2)	0.936
Gentamicin, n (%)	2 (6.3)	3 (4.7)	0.749
Gentamicin, dužina terapije, dani±SD	6.0 (±2.8)	5.8 (±1.6)	1.000
Netilmicin, n (%)	1 (3.1)	2 (3.1)	1.000
Netilmicin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Azitromicin, n (%)	5 (15.6)	5 (7.8)	0.249
Azitromicin, dužina terapije, dani±SD	3.8 (±1.1)	5.2 (±2.9)	
Trimetoprim/sulfametoksazol, n (%)	1 (1.3)	0 (0.0)	0.136
Trimetoprim/sulfametoksazol, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Vankomicin, n (%)	8 (25.0)	8 (12.5)	0.130
Vankomicin, dužina terapije, dani±SD	14.9 (±7.9)	14.9 (±11.0)	
Klindamicin, n (%)	4 (12.5)	13 (20.3)	0.333
Klindamicin, dužina terapije, dani±SD	3.4 (±2.2)	8.8 (±4.6)	0.026
Metronidazol, n (%)	2 (6.3)	2 (3.1)	0.482
Metronidazol, dužina terapije, dani±SD	7.5 (±4.9)	8.5 (±7.7)	1.000
Flukonazol, n (%)	6 (18.8)	8 (12.5)	0.420
Flukonazol, dužina terapije, dani±SD	11.8 (±4.8)	11.3 (±3.2)	0.754

Tablica 9. Antimikrobna terapija koja je prethodila izolaciji uzročnika.

Antimikrobna terapija koja je prethodila izolaciji uzročnika	ESBL (N=32)	ne-ESBL (N=64)	p-vrijednost
Karbapenemi, n (%)	5 (15.6)	5 (7.8)	0.249
Karbapenemi, dužina terapije, dani±SD	10.4 (±3.9)	14.0 (±7.6)	0.690
Penicilini, n (%)	9 (28.1)	10 (15.6)	0.155
Penicilini, dužina terapije, dani±SD	7.2 (±6.1)	15.2 (±10.3)	0.017
Penicilini/inhibitori beta-laktamaze, n (%)	6 (18.8)	9 (14.1)	0.555
Penicilini/inhibitori beta-laktamaze, dužina terapije, dani±SD	9.0 (±6.8)	14.9 (±9.5)	0.145

Ampicilin/sulbaktam, n (%)	-	-	
Ampicilin/sulbaktam, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Piperacilin/tazobaktam, n (%)	1 (3.1)	6 (9.4)	0.235
Piperacilin/tazobaktam, dužina terapije, dani±SD	10.0 (-)	16.7 (9.4)	-
Amoksicilin/klavulanska kiselina, n (%)	6 (18.7)	4 (6.3)	0.067
Amoksicilin/klavulanska kiselina, dužina terapije, dani±SD	7.3 (±4.8)	8.5 (±3.1)	0.476
Cefalosporini, n (%)	8 (25.0)	8 (12.5)	0.130
Cefalosporini, dužina terapije, dani±SD	10.8 (±7.7)	8.9 (±4.2)	0.798
Cefazolin, n (%)	0 (0.00)	1 (1.6)	0.366
Cefazolin, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Cefuroksim, n (%)	6 (18.8)	6 (9.4)	0.201
Cefuroksim, dužina terapije, dani±SD	8.2 (±5.6)	7.3 (±3.2)	0.699
Cefalosporini 3.generacije, n (%)	2 (6.3)	1 (1.6)	0.231
Cefalosporini 3.generacije, dani±SD	15.0 (±15.6)	11.0 (-)	-
Fluorokinoloni, n (%)	6 (18.8)	3 (4.7)	0.031
Fluorokinoloni, dužina terapije, dani±SD	4.7 (±2.5)	7.6 (±1.5)	
Aminoglikozidi, n (%)	6 (18.8)	5 (7.8)	0.123
Aminoglikozidi, dužina terapije, dani±SD	11.2 (±5.8)	12.0 (±5.6)	0.792
Azitromicin, n (%)	5 (15.6)	1 (1.6)	0.009
Azitromicin, dužina terapije, dani±SD	3.8 (±1.2)	6.0 (-)	-
Vankomicin, n (%)	1 (3.1)	3 (4.7)	0.712
Vankomicin, dužina terapije, dani±SD	18.0 (-)	17.7 (±14.8)	-
Klindamicin, n (%)	2 (6.3)	4 (6.3)	1.000
Klindamicin, dužina terapije, dani±SD	4.5 (±3.5)	9.0 (±3.2)	0.267
Metronidazol, n (%)	1 (3.1)	0 (0.0)	0.329
Metronidazol, dužina terapije, dani±SD	-	-	
Flukonazol, n (%)	4 (12.5)	5 (7.8)	0.466
Flukonazol dužina terapije, dani±SD	13.5 (±4.8)	10.2 (±3.6)	0.286

Podaci o tipu i primjerenosti antibiotske terapije u istraživanim skupinama te ishodi prikazani su u tablici 10.

Prema očekivanju, s obzirom na profil rezistencije ESBL sojeva, u znatno više slučajeva trebalo je promijeniti empirijsku terapiju po identifikaciji uzročnika i dobivanju antibiograma (73% i 9%, $p < 0.001$). U ukupno 4 od 7 umrlih bolesnika s infekcijom ESBL, u vrijeme smrti antimikrobna terapija nije bila adekvatna. Svi bolesnici koji su

primali neadekvatnu terapiju imali su u vrijeme smrti znakove infekcije, a smrt je bila povezana s infekcijom u 2 od navedena 4 bolesnika. Od 2 bolesnika u kojih je smrti bila povezana s infekcijom, jedan bolesnik bio je na terapiji norfloksacinom, a jedan je bolesnik bio na terapiji kombinacijom ceftriaksona i metronidazola. Od preostala 2 bolesnika koji su umrli zbog osnovne bolesti a liječeni su u vrijeme smrti neadekvatnom antibiotskom terapijom, jedan bolesnik je primao ciprofloksacin a drugi amoksicilin/klavulansku kiselinu uz prisutnost znakova infekcije. Primarni uzrok smrti u oba bolesnika nije bio infekcija već osnovna bolest (intracerebralno krvarenje i cerebrovaskularni inzult).

Pridružena infekcije gram-pozitivnim uzročnikom te infekcija rezistentnim gram pozitivnim uzročnikom (MRSA) bila je jednako učestala u slučajeva i kontrola. Više je smrtnih ishoda zabilježeno u skupini s ESBL infekcijom u odnosu na kontrolu (22% vs. 14%). Iako ta razlika nije statistički značajna, može se smatrati klinički značajnom. Dva smrtna ishoda u ESBL skupini bila su povezana s infekcijom, dok niti jedan smrtni slučaj nije bio povezan s infekcijom u kontrolnoj skupini (2/7 vs. 0/9, $p=0.055$). Iako to ponovno nije rezultiralo u p -vrijednosti koja bi označila statističku značajnost ove razlike, ipak se ovaj rezultat treba smatrati klinički značajnim.

Tablica 10. Karakteristike antibiotske terapije i ishodi.

	ESBL, n (%) (N=32)	ne-ESBL, n (%) (N=64)	p-vrijednost
Infekcija kod prijema	8 (25.0)	14 (21.9)	0.733
Antibiotska terapija započeta kao:			0.366
- empirijska	26 (81.3)	47 (73.4)	
- ciljana	6 (18.7)	15 (23.4)	
- bez terapije	0 (0.0)	2 (3.2)	
Primjerenost empirijske antibiotske terapije			
Neadekvatna empirijska terapija, n (%)	19/26 (73.1)	4/47 (8.5)	<0.001
Neprijemljena antibiotska terapija nakon dobivanja antibiograma, n (%)	6/26 (23.1)	0/47 (0.0)	<0.001
Infekcija gram (+) uzročnikom	8 (25)	14 (21.9)	0.733
Infekcija rezistentnim gram (+) uzročnikom	4 (12.5)	4 (6.3)	0.516
Gljivična infekcija	3 (9.4)	6 (9.4)	1.000
Ishodi			

- Smrtni ishod, n (%)	7 (21.8)	9 (14.1)	0.340
- Smrt povezana s infekcijom, n (%)	2/7 (28.6)	0/9 (0.00)	0.055
- Neprimjerena antimikrobna terapija kod umrlih, n (%)	4/7 (57.1)	0/9 (0.0)	<0.001

Antibiotici najčešće zastupljeni u neadekvatnoj empirijskoj antibiotskoj terapiji bili su amoksisilin/klavulanska kiselina (17%), cefuroksim (14%), amikacin (11%) i vankomicin (8%) (vidi Tablicu 11).

Tablica 11. Neadekvatna empirijska antibiotska terapija ESBL infekcija.

Empirijski propisani antibiotici	N	%
amoksisilin/klavulanska kiselina	6	16,7
cefuroksim	5	13,9
amikacin	4	11,1
vankomicin	3	8,3
azitromicin	2	5,6
ciprofloksacin	2	5,6
klindamicin	2	5,6
kloksacilin	2	5,6
metronidazol	2	5,6
norfloksacin	2	5,6
ampicilin	1	2,8
ceftriakson	1	2,8
netilmicin	1	2,8
penicilin G	1	2,8
piperacilin/tazobaktam	1	2,8
trimetoprim/sulfametoksazol	1	2,8
Ukupno	36	100,0

U bolesnika koji su primali neadekvatnu antibiotsku terapiju ESBL infekcije i nakon pristizanja antibiograma (6 bolesnika), bili su propisani norfloksacin, sulfametoksazol/trimetoprim, metronidazol, ceftriakson, ciprofloksacin i amoksisilin/klavulanska kiselina (vidi Tablicu 12). U adekvatnoj antibiotskoj terapiji bolesnika s infekcijom ESBL sojem najzastupljeniji je bio meropenem (57% od ukupnog broja adekvatno propisanih antibiotika te 60% svih bolesnika sa adekvatno propisanom ciljanom terapijom) a potom amikacin (29% od ukupnog broja adekvatno propisanih antibiotika te 15% od svih bolesnika sa adekvatno propisanom ciljanom

antibiotskom terapijom). U svim slučajevima kada je amikacin bio propisan kao monoterapija ESBL infekcije radilo se o infekcijama mokraćnog sustava a ishod je bio izliječenje infekcije (vidi Tablicu 13).

Tablica 12. Antibiotička terapija po pristizanju antibiograma s izolacijom ESBL soja.

Antibiotik	N	%
Neadekvatna		
norfloksacin	2	28,6
sulfametoksazol/trimetoprim	1	14,3
metronidazol	1	14,3
ceftriakson	1	14,3
ciprofloksacin	1	14,3
amoksicilin/klavulanska kiselina	1	14,3
<i>UKUPNO</i>	<i>7</i>	<i>100,0</i>
Adekvatna		
meropenem	12	57,1
amikacin	6	28,6
ciprofloksacin	1	4,8
gentamicin	1	4,8
imipenem/cilastatin	1	4,8
<i>UKUPNO</i>	<i>21</i>	<i>100,0</i>

U tablici 13 prikazano je empirijsko liječenje i liječenje po pristizanju antibiograma bolesnika sa ESBL infekcijom u promatranim JIL.

Tablica 13. Liječenje bolesnika s ESBL infekcijom.

R.br.	Dg infekcije	Mjesto izolacije ESBL soja	Empirijska terapija	Učinak na ESBL soj	Terapija po pristizanju antibiograma	Osjetljivo st ESBL soja*	Ishod
Empirijska terapija							
1	Infekcija urinarnog sustava	UK	amikacin, cefuroksim, trimetoprim/sulfametoksazol, penicilin G	NE	sulfametoksazol/trime topirim	R	Poboljšanje
2	Sepsa	UK	metronidazol, ceftriakson	NE	metronidazol, ceftriakson	R	Smrt povezana s infekcijom
3	Infekcija respiratornog sustava	AT	ciprofloksacin, amoksicilin/klavulanska kiselina	NE	ciprofloksacin	R	Smrt zbog osnovne bolesti
4	Infekcija urinarnog sustava	UK	norfloksacin	NE	norfloksacin	R	Poboljšanje
5	Infekcija urinarnog sustava	UK	amoksicilin/klavulanska kiselina	NE	amoksicilin/klavulanska kiselina	R	Smrt zbog osnovne bolesti
6	Infekcija urinarnog sustava	UK	cefuroksim, metronidazol	NE	amikacin, cefepim	I, R	Poboljšanje
7	Infekcija respiratornog sustava	ŽS	vankomicin, azitromicin, klindamicin, netilmicin	NE	gentamicin, ampicilin/sulbaktam	I, R	Poboljšanje
8	Infekcija urinarnog sustava	UK	amikacin	NE	meropenem	S	Poboljšanje
9	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava	CVK	azitromicin, kloksacilin, amikacin	NE	meropenem	S	Poboljšanje
10	Urinarnog sustava, respiratornog sustava	ŽS	amoksicilin/klavulanska kiselina	NE	meropenem	S	Poboljšanje

11	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava, meningitis	LIKVOR	klindamicin, klonksacilin	NE	meropenem, vankomicin, cefepim, piperacilin/tazobactam, amikacin	S	Poboljšanje
12	Infekcija respiratornog sustava	HK	cefuroksim, amikacin	NE	meropenem, piperacilin/tazobactam, klindamicin, ampicilin	S	Poboljšanje
13	Infekcija urinarnog sustava	UK	vankomicin, piperacilin/tazobaktam	NE	meropenem	S	Poboljšanje
14	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava	UK	amoksicilin/ klavulanska kiselina	NE	meropenem	S	Poboljšanje
15	Infekcija urinarnog sustava	UK	cefuroksim, amoksicilin/ klavulanska kiselina	NE	ciprofloksacin	S	Poboljšanje
16	Infekcija urinarnog sustava	UK	ciprofloksacin	NE	meropenem	S	Poboljšanje
17	Infekcija urinarnog sustava	UK	norfloksacin	NE	meropenem	S	Smrt zbog osnovne bolesti
18	Sepsa, Infekcija urinarnog sustava	HK, UK	vankomicin, ampicilin	NE	amikacin, vankomicin, ampicilin	S	poboljšanje
19	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava	UK	azitromicin, cefuroksim, meropenem, vankomicin	DA	norfloksacin	R	Smrt povezana s infekcijom
20	Infekcija urinarnog sustava	UK	meropenem	DA	meropenem	S	Poboljšanje
21	Infekcija respiratornog sustava	ŽS	meropenem	DA	imipenem/cilastatin, amikacin	S	Smrt zbog osnovne bolesti

22	Sepsa	HK	vankomicin, piperacilin/ tazobaktam, amikacin	DA	vankomicin, piperacilin/tazobakta m, amikacin	S	Poboljšanje
23	Infekcija urinarnog sustava	UK	ciprofloksacin, meropenem	DA	meropenem	S	Poboljšanje
24	Sepsa	HK	meropenem	DA	meropenem	S	Poboljšanje
25	Infekcija urinarnog sustava	UK	amikacin	DA	amikacin	S	poboljšanje
26	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava	UK	cefuroksim, amoksisilin/ klavulanska kiselina		klindamicin, amikacin	S	Smrt zbog osnovne bolesti
Cijijana terapija							
27	Infekcija respiratornog sustava	ŽS			Piperacilin/tazobakta m	R	Poboljšanje
28	Infekcija respiratornog sustava	AT			meropenem	S	Poboljšanje
29	Infekcija respiratornog sustava	AT			ciprofloksacin	S	Poboljšanje
30	Infekcija urinarnog sustava	UK			amikacin	S	Poboljšanje
31	Infekcija urinarnog sustava	UK			meropenem	S	Poboljšanje
32	Infekcija urinarnog i respiratornog sustava	UK			meropenem	S	Poboljšanje

*S- senzitivn (osjetljiv); I- intermedijarno osjetljiv; R- rezistentan; UK- urinokultura, HK- hemokultura; AT- aspirat traheje, ŽS- želučani sok; CVK- vrh centralnog venskog katetera

Analiza čimbenika rizika za infekciju ESBL *K.pneumoniae* i *E.coli*

U Tablici 14 prikazana je analiza čimbenika rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC. Ova analiza pokazala je da je rizik od infekcije ESBL sojem KP i EC značajno povećan u ovisnosti o prethodnoj antimikrobnoj terapiji OR 4.5 (95%CI 1.8-11.2), $p=0.001$], dužini hospitalizacije u JIL [OR 1.1 (1.12-1.11), $p=0.005$], dužini prethodne antimikrobne terapije [OR 1.1 (1.02-1.18), $p=0.001$] te broju prethodno primijenjenih antibiotika [OR 1.4 (95%CI 1.1-1.9, $p=0.003$].

Od specifičnih antibiotika, rizik za ESBL infekciju povećava prethodna primjena makrolida [OR 11.7 (95% CI 1.3-104.6), $p=0.015$] i fluorokinolona [OR 4.7 (95%CI 1.08-20.2), $p=0.056$]. Prethodna primjena ostalih skupina antibiotika ili pojedinačnih antibiotika nije u ovoj studiji bila značajan prediktor infekcije ESBL sojem.

Tablica 14. Analiza čimbenika rizika za infekciju ESBL producirajućim sojem *E.coli* i *K.pneumoniae*.

Čimbenik rizika	OR (95%CI)	p-vrijednost
Dob (godine)	0.99 (0.96-1.02)	0.544
APACHE II	1.02 (0.96-1.09)	0.451
Hospitalizacija u JIL prije izolacije uzročnika (dani)	1.06 (1.01-1.11)	0.005
Prethodna antimikrobna terapija	4.51 (1.81-11.21)	0.001
Dužina prethodne antimikrobne terapije (dani)	1.10 (1.02-1.18)	0.001
Broj prethodno primijenjenih antibiotika	1.43 (1.10-1.85)	0.003
Prethodna primjena antibiotika		
Karbapenemi	2.18 (0.58-8.18)	0.293
Penicilini	2.11 (0.75-5.88)	0.178
Amoksicilin/klavulanska kiselina	3.44 (0.89-13.20)	0.079
Cefalosporini	2.33 (0.78-6.94)	0.149
Fluorokinoloni	4.69 (1.08-20.20)	0.056
Makrolidi	11.67 (1.30-104.65)	0.015
Aminoglikozidi	2.73 (0.76-9.72)	0.172
Glikopeptidi	0.65 (0.07-6.56)	1.000
Komorbidity		
diabetes mellitus	3.30 (0.95-11.41)	0.097
renalna insuficijencija	1.71 (0.67-4.34)	0.330
hemodijaliza	1.00 (0.17-5.77)	1.000
kardiovaskularna bolest	0.59 (0.23-1.53)	0.356

cerebrovaskularna bolest	1.77 (0.75-4.17)	0.275
hipertenzija	1.37 (0.58-3.21)	0.518
maligna bolest	0.75 (0.29-1.89)	0.646
imunosupresivna terapija	1.38 (0.36-5.29)	0.726
KOPB	0.65 (0.06-6.56)	1.000
jetrena lezija	-	-
Rizični faktori/Intervencije u JIL		
Centralni venski kateter	0.21 (0.05-0.91)	0.056
Urinarni kateter	-	
Mehanička ventilacija	0.47 (0.17-1.32)	0.228
Transfuzija	1.00 (0.08-11.46)	1.000

APACHE II- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; OR- *odds ratio* (omjer izgleda); CI- *confidence interval* (interval pouzdanosti); KOPB- kronična opstruktivna plućna bolest

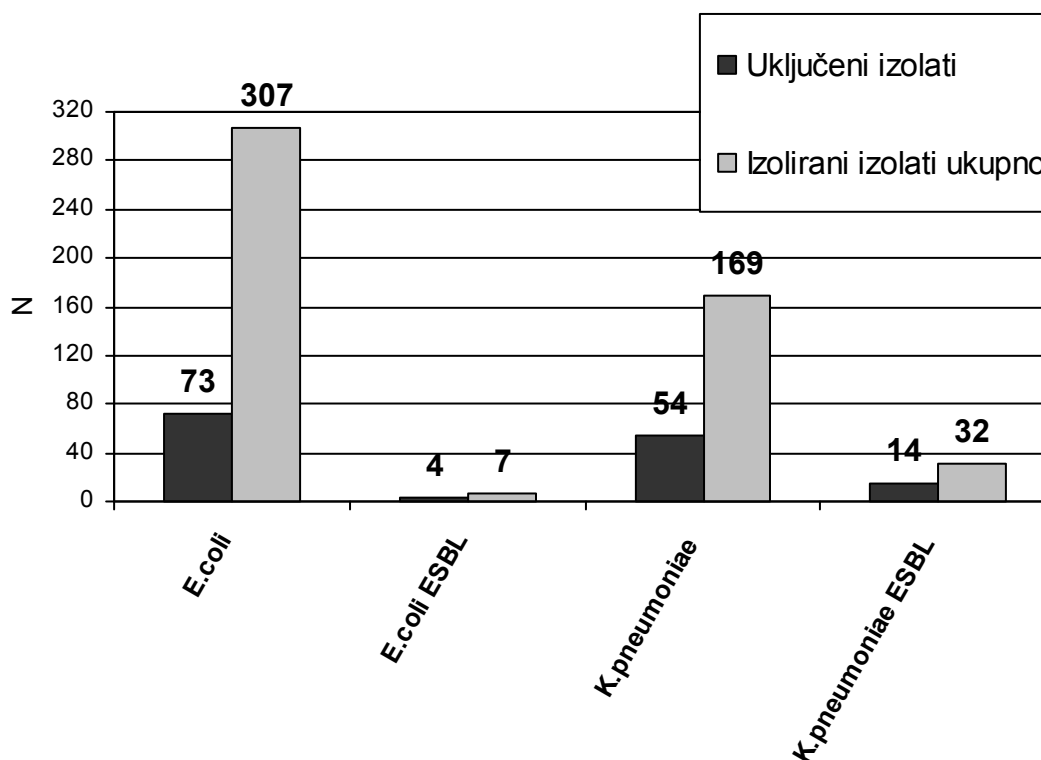
STUDIJA MOLEKULARNE EPIDEMIOLOGIJE

Studija molekularne epidemiologije povezana je sa studijom kontrole slučajeva jer je uključila reprezentativni uzorak ESBL i ne-ESBL izolata iz razdoblja provođenja studije. Osim za dostupne izolate bolesnika uključenih u kontrolnu skupinu *case-control* studije, genotipizacija je učinjena i za dodatne dostupne izolate da bi se dobila potpunija epidemiološka slika. To su izolati KP i EC bolesnika koji nisu uključeni kao kontrole u *case-control* studiju (iz istog razdoblja i istih JIL).

U tablici 15 i na slici 15 prikazan je broj uzoraka ESBL producirajućih te običnih KP i EC sojeva ukupno te broj uzoraka uključenih u studiju molekularne epidemiologije. Ukupno je u tom razdoblju izolirano 307 uzoraka EC i 169 uzoraka KP, u 7 bolesnika izolirana je EC ESBL, a u 32 bolesnika izolirana je KP ESBL. U istraživanje je uključeno 4 izolata EC ESBL i 28 izolata KP ESBL (Slika 14).

PFGE genotipizacija i identifikacija tipa ESBL te učinjeno je za 100% (4/4) uzoraka EC ESBL i 50% (16/32) uzoraka KP ESBL. Genotipizacija je učinjena za 24% (73/307) uzoraka EC i 32% (54/169) uzoraka KP.

Slika 15. Uzorci uključeni u studiju molekularne epidemiologije.



Tablica 15. Uzorci ukupno i uključeni u studiju molekularne epidemiologije po JIL.

Uzorak/ Intenzivna skrb	Broj genotipiziranih izolata	Broj izolata ukupno	% genotipiziranih izolata
<i>E.coli</i>			
AIN	40	90	44.4
ISH	11	65	16.9
NRL	22	152	14.5
<i>Ukupno</i>	73	307	23.7
<i>E.coli</i> ESBL			
AIN	3	3	100.0
ISH	0	0	0.0
NRL	1	4	25.0
<i>Ukupno</i>	4	7	66.7
<i>K.pneumoniae</i>			
AIN	41	62	66.1
ISH	2	17	11.8
NRL	11	90	12.2
<i>Ukupno</i>	54	169	31.9
<i>K.pneumoniae</i> ESBL			
AIN	7	13	53.8
ISH	4	5	80.0
NRL	3	14	21.4
<i>Ukupno</i>	14	32	43.7

Rezistencija na antibiotike

Rezistencija na antibiotike u KP i EC te KP i EC ESBL izolata uključenih u studiju molekularne epidemiologije prikazana je u tablicama 16 i 17 te na slikama 16-19.

Tablica 16. Rezistencija na antibiotike ESBL izolata KP i EC.

Antibiotik	KP ESBL (R/I)*		EC ESBL (R/I)	
	N	%	N	%
ampicilin	13	100,0	4	100,0
ampicilin/sulbaktam	13	100,0	1	25,0
piperacilin/tazobaktam	8	61,5	3	75,0
cefazolin	13	100,0	4	100,0
cefoksitin	9	69,2	0	0,0

ceftazidim	13	100,0	3	75,0
ceftriakson	13	100,0	3	75,0
cefepim	13	100,0	3	75,0
imipenem	0	0,0	0	0,0
meropenem	0	0,0	0	0,0
amikacin	11	84,6	3	75,0
gentamicin	13	100,0	3	75,0
tobramicin	12	92,3	3	75,0
ciprofloksacin	7	53,8	0	0,0
levofloksacin	7	53,8	0	0,0
nitrofurantoin	7	53,8	0	0,0
trimetoprim/sulfametoksazol	8	61,5	3	75,0

*u rezistentne izolate ubrojani su i intermedijarno rezistentni izolati

Tablica 17. Rezistencija na antibiotike izolata KP i EC.

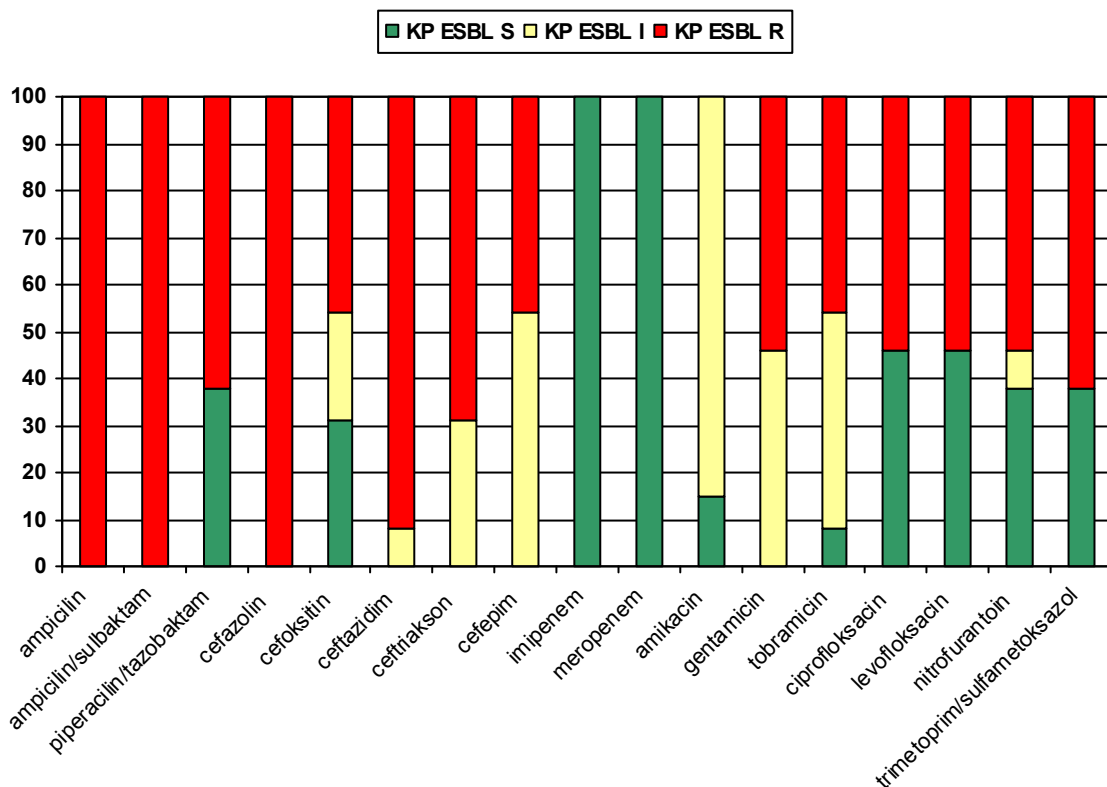
Antibiotik	KP (R/I)*		EC (R/I)	
	N	%	N	%
ampicilin	51	100.0	16	26.8
ampicilin/sulbaktam	0	0.0	13	21.1
piperacilin/tazobaktam	2	3.9	1	9.9
cefazolin	5	23.1	1	4.2
cefoksitin	0	0.0	1	2.8
ceftazidim	0	0.0	0	0.0
ceftriakson	0	0.0	0	0.0
cefepim	0	0.0	0	0.0
imipenem	0	0.0	0	0.0
meropenem	0	0.0	0	0.0
amikacin	0	0.0	0	0.0
gentamicin	2	3.9	0	0.0
tobramicin	2	3.9	0	0.0
ciprofloksacin	1	1.9	1	1.4
levofloksacin	2	1.9	1	1.4
nitrofurantoin	8	68.6	1	2.8
trimetoprim/sulfametoksazol	2	3.9	1	1.4

U odnosu na podatke o KP i KP ESBL izolatima sa područja Republike Hrvatske¹⁰³, izolati u ovoj studiji pokazuju veću rezistenciju na sve ispitivane cefalosporine,

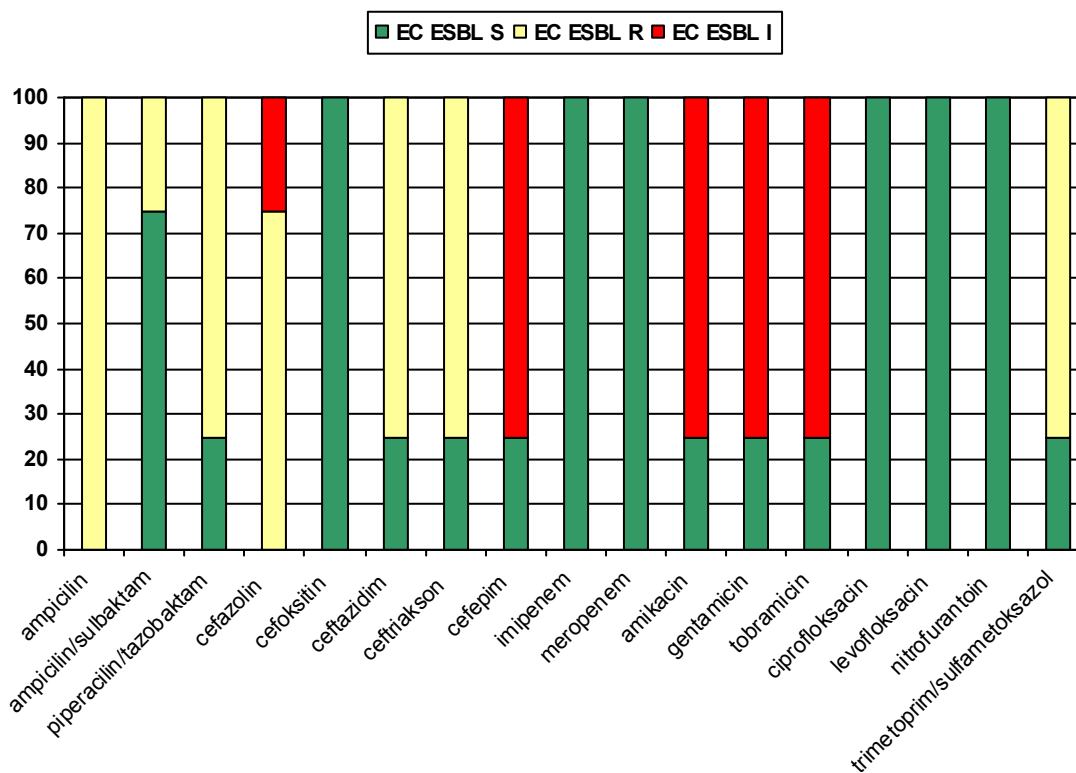
piperacilin/tazobaktam te aminoglikozide, dok je rezistencija na fluorokinolone gotovo istovjetna (54%).

U izolatima evaluiranim u ovoj studiji uočava se razlika u rezistenciji na fluorokinolone i nitrofurantoin koja je značajno učestalija u KP ESBL izolatima u odnosu na EC ESBL izolate. Sva 4 EC ESBL izolata su bila osjetljiva na fluorokinolone, a samo 46% KP ESBL. Utvrđena je podjednaka učestalost rezistencije na aminoglikozide. Svi ESBL izolati osjetljivi su na karbapeneme. U običnih izolata EC i KP, zapaža se razlika u rezistenciji na ampicilin koja je prisutna u svih KP izolata (intrinzički) te u 25% izolata EC, na ampicilin/klavulansku kiselinu koja nije zabilježena u izolatima KP ali jest u 20% izolata EC, na nitrofurantoin koja je prisutna u oko 70% izolata KP a tek u oko 3% izolata EC te rezistenciji na cefazolin koja je prisutna u oko 22% izolata KP a tek oko 3% izolata EC. Osjetljivost običnih izolata KP i EC na fluorokinolone, aminoglikozide, cefalosporine treće generacije i piperacilin/tazobaktam je >90%. Svi izolati KP i EC osjetljivi su na karbapeneme. Rezistencija običnih i ESBL sojeva EC i KP prikazana je na slikama 16-19.

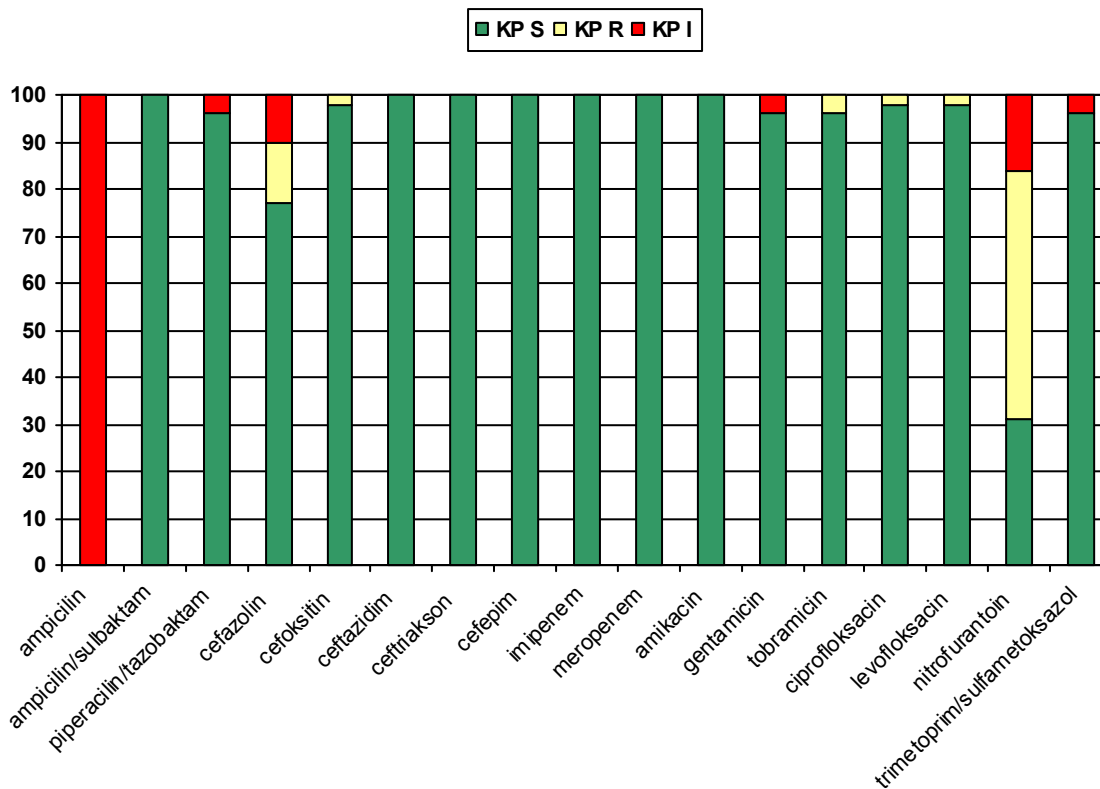
Slika 16. Rezistencija na antibiotike KP ESBL.



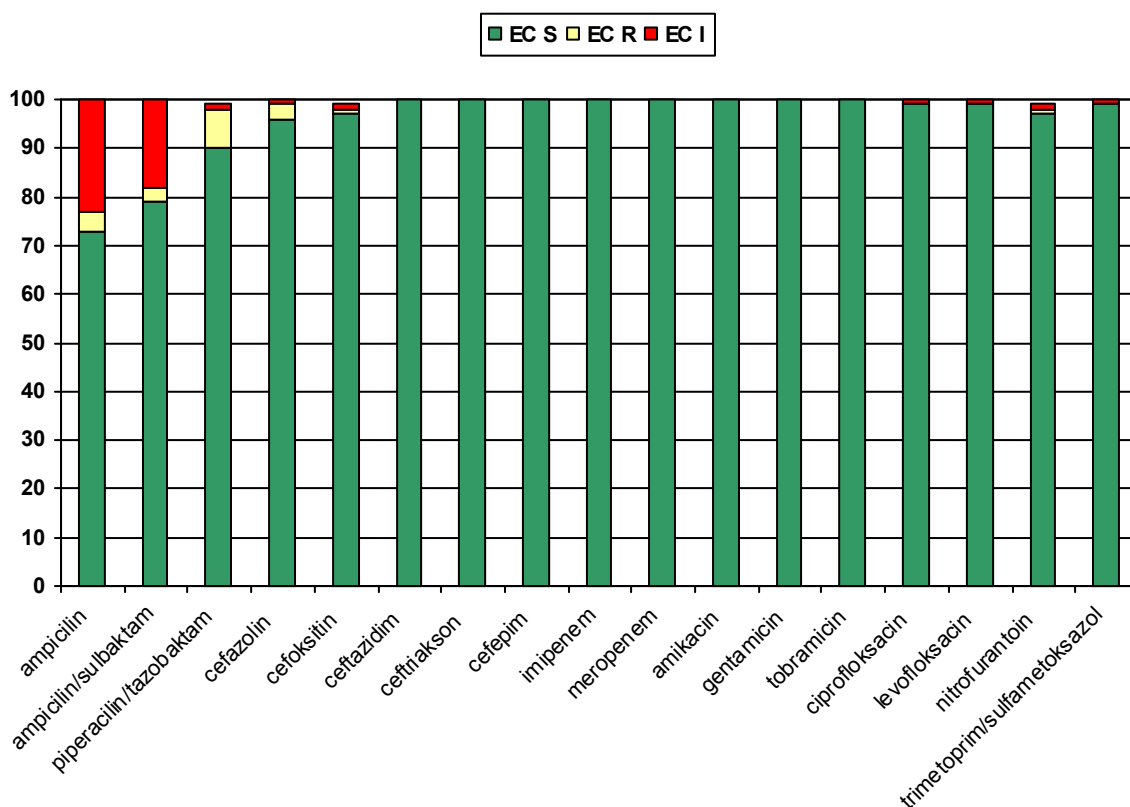
Slika 17. Rezistencija na antibiotike EC ESBL.



Slika 18. Rezistencija KP na antibiotike.



Slika 19. Rezistencija EC na antibiotike.



MDR izolati KP i EC ESBL

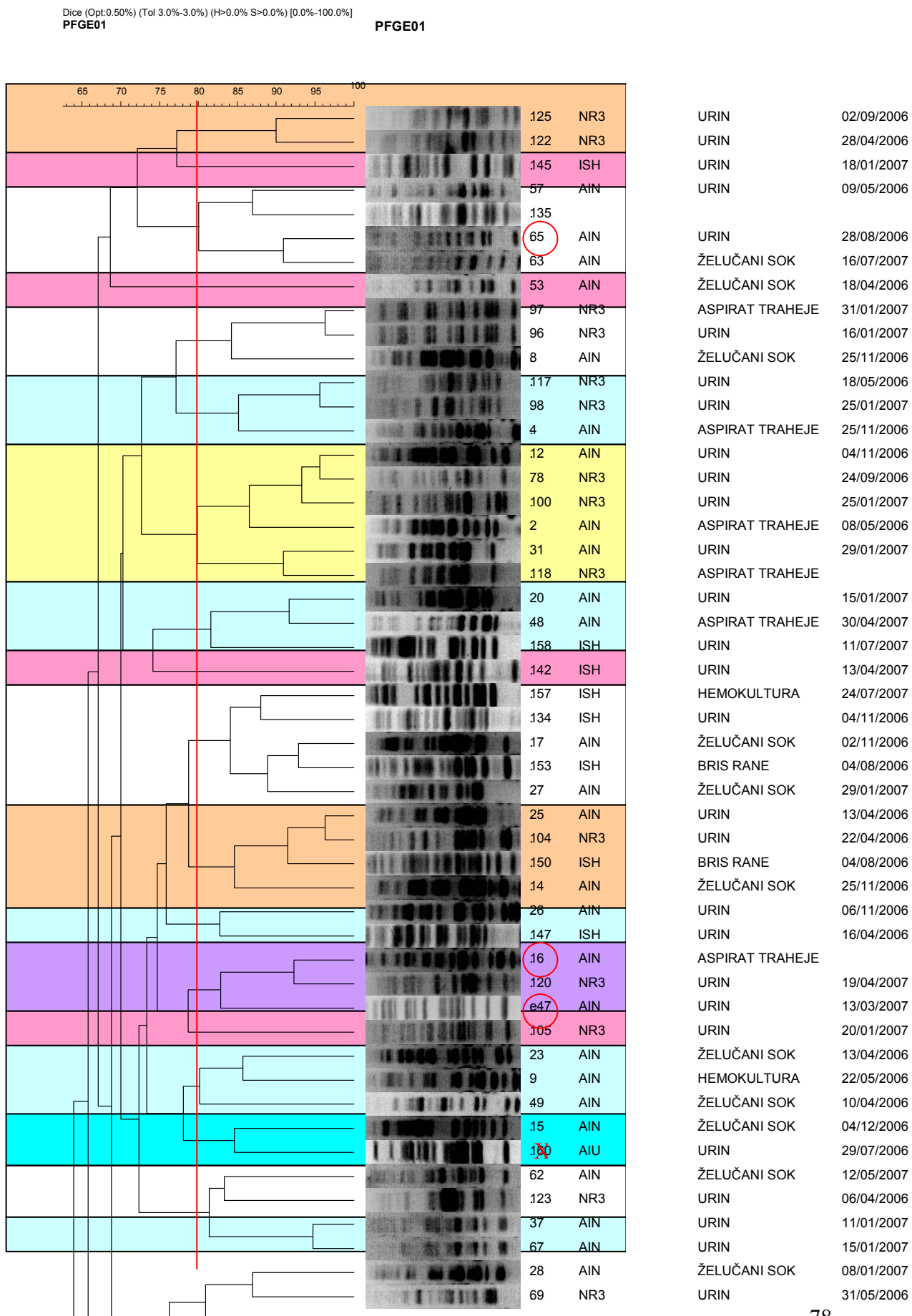
Od svih ESBL izolata koji su uključeni u studiju molekularne epidemiologije, ukupno je izolirano 41.2% MDR izolata (rezistentnih dodatno na aminoglikozide, fluorokinolone i sulfametoksazol/trimetoprim). S obzirom da su svi MDR izolati bili izolati KP ESBL, zabilježena učestalost MDR ESBL izolata u KP bila je 53.8%.

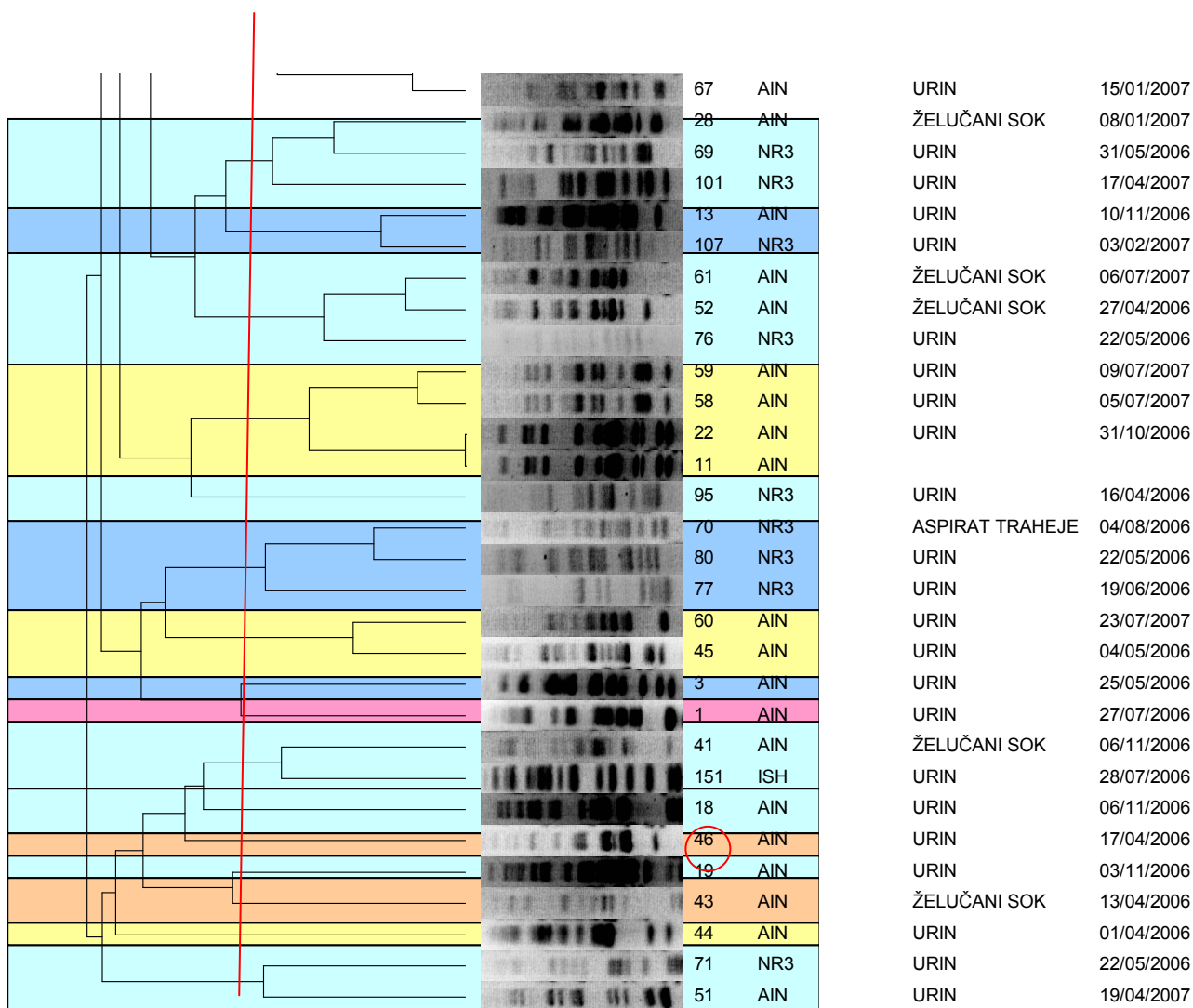
Rezultati PFGE analize

U nastavku je prikazan dendogram za gore navedene reprezentativne uzorke EC i KP, uključujući i ESBL sojeve, koji služi za vizualnu evaluaciju sličnosti izolata (Slika 20 i slika 21). Crvenom okomitom crtom naznačena je razina 80%-tne sličnosti uzoraka. Svi izolati kod kojih je genetska sličnost $\geq 80\%$ smatraju se genetski povezanim izolatima. PFGE analiza uzoraka EC pokazuje da je ukupno 77 uzoraka razvrstano u 34 različite grupe sa 1-4 uzorka u svakoj. Ukupno je 4 izolata EC ESBL koji su svrstani u 3 različite grupe; jedna grupa sadržava 2 izolata sa 82%-tnom sličnosti. Ova 2 uzorka vjerojatno nisu epidemiološki povezana. Oba uzorka su iz iste neurokirurške JIL, ali su izolirani sa 2 mjeseca odmaka (uzorak broj 16 izoliran

je 18.01.2007. u aspiratu traheje a uzorak broj 47 izoliran je 13.3.2007.godine iz urinokulture). U dendogramu su brojevi EC ESBL izolata:16, 46, 47 i 65.

Slika 20. Dendrogram za izolate *E.coli*.





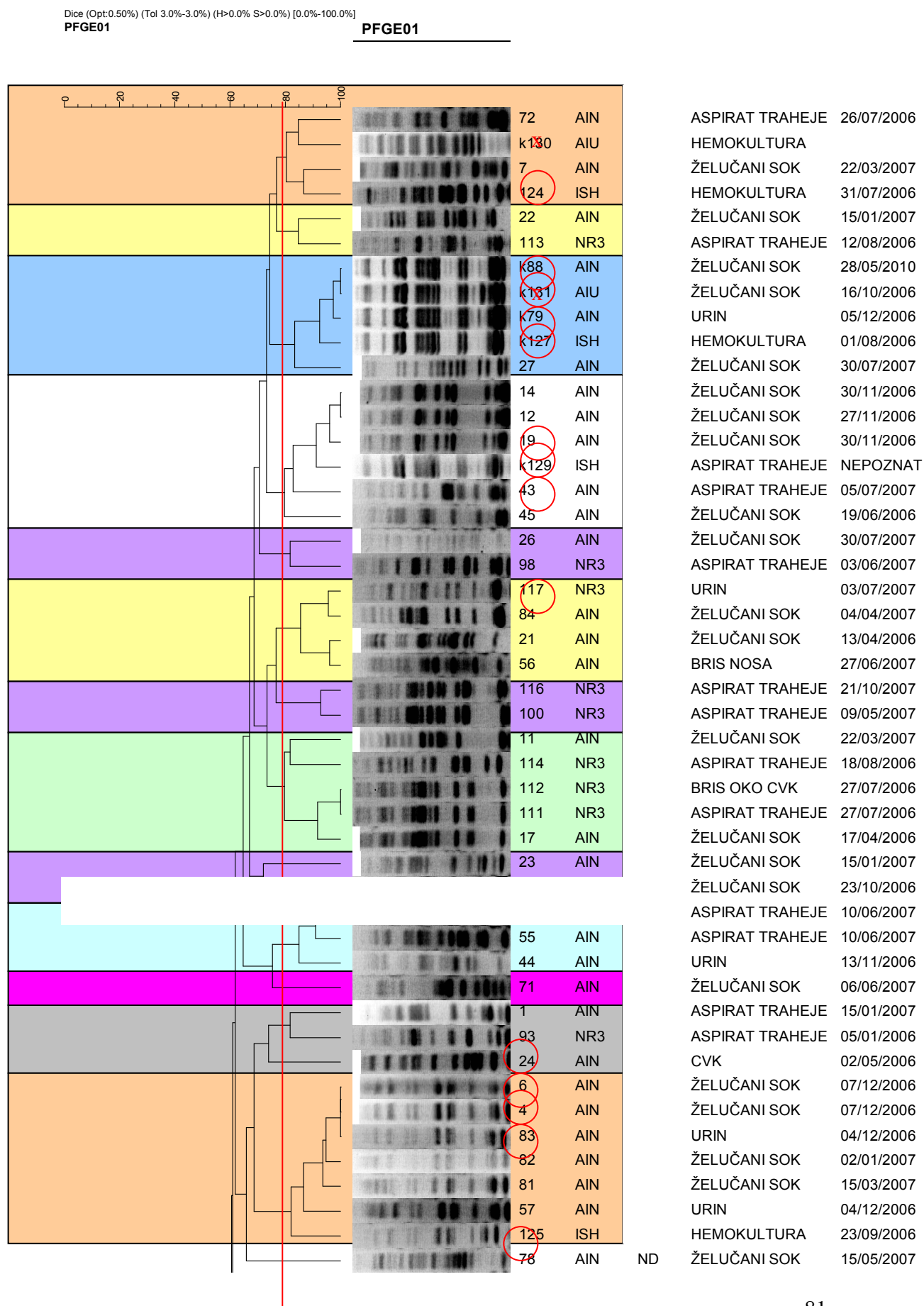
Napomena: Uzorak broj 160 je iz urološke intenzivne (AIU) te nije uzet u obzir kod interpretacije dendrograma. Pojednim uzorcima ne-ESBL sojeva dodatno uključenim u PFGE analizu radi povećanja reprezentativnosti uzorka nedostaju pojedini podatci (datum izolacije, mjesto izolacije) što nije bilo od presudnog značenja za ovu analizu.

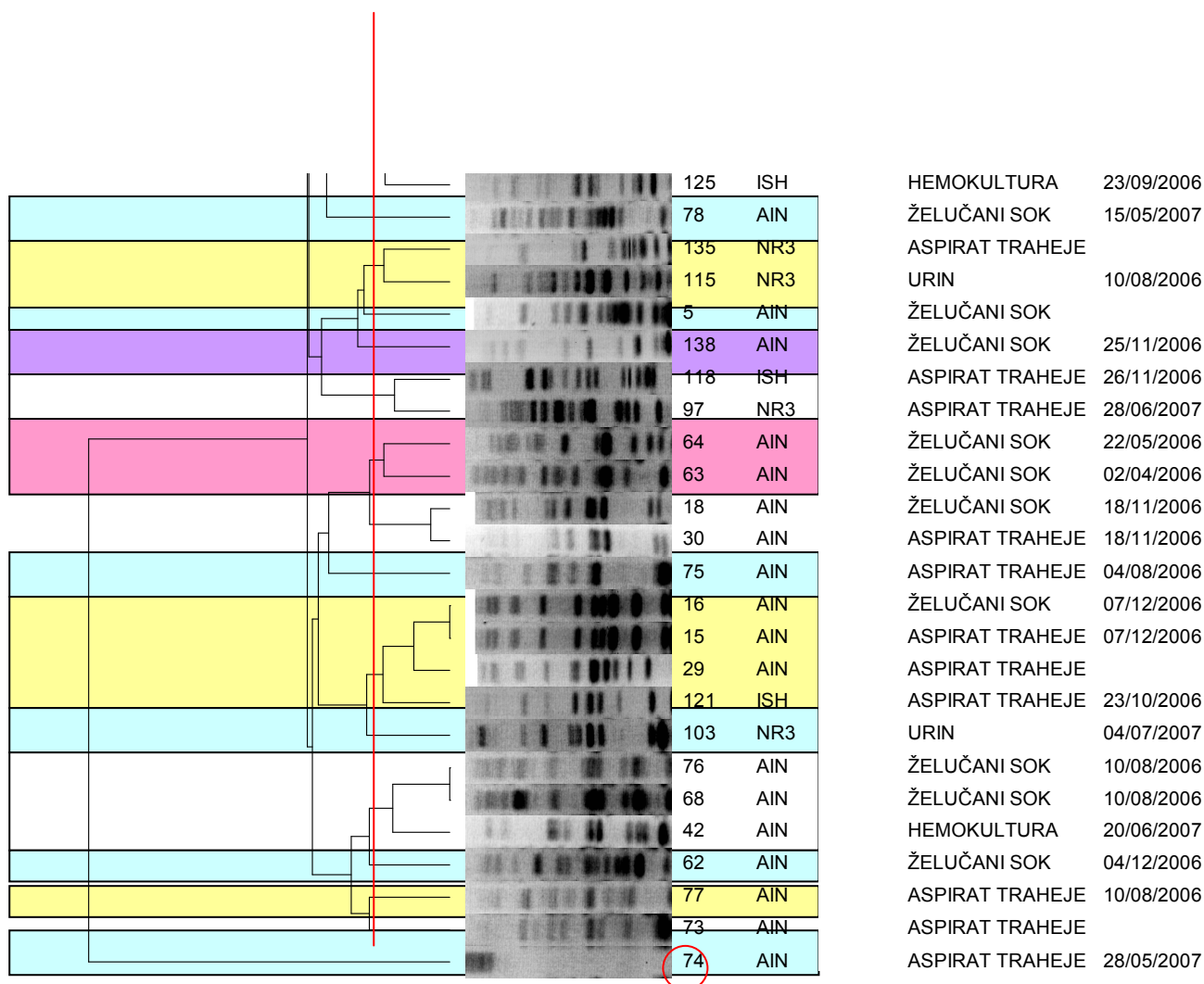
PFGE analiza uzoraka KP pokazuje da je ukupno 72 uzoraka razvrstano u 28 različitih grupa sa 1-7 uzorka u svakoj. Ukupno je 14 izolata KP ESBL koji su svrstani u 7 različitih grupa sa 1-4 izolata u svakoj.

U grupi u koju su po sličnosti svrstana po 4 izolata KP ESBL, radi se o širenju jednog klona na 3 bolesnika, 4. izolat u toj skupini ne može se vremenski niti po mjestu izolacije povezati sa ostala 3 izolata KP ESBL. Taj izolat (izolati 125) pokazuje 85% sličnosti sa prva tri uzorka (izolati 6, 4, 83) i vjerojatno nije

epidemiološki povezan s prethodna 3 izolata KP ESBL. U dendogramu su brojevi KP ESBL izolata: 24, 88, 124, 127, 125, 19, 83, 79, 6, 4, 74, 117, 43 i 129.

Slika 21. Dendrogram za izolate *K.pneumoniae*.





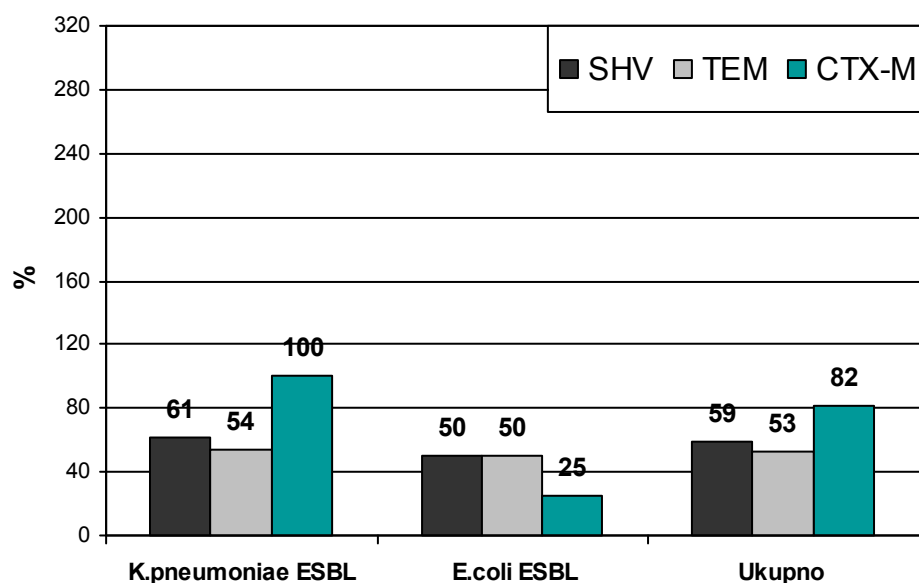
Napomena: Uzorci broj 130 i 131 je iz urološke intenzivne (AIU) i nisu uzeti u obzir kod interpretacije dendograma. Pojednim uzorcima ne-ESBL sojeva dodatno uključenim u PFGE analizu radi povećanja reprezentativnosti uzorka nedostaju pojedini podatci (datum izolacije, mjesto izolacije) što nije bilo od presudnog značenja za ovu analizu.

Karakterizacija tipa ESBL

Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) ispitana je pripadnost ESBL porodicama: SHV, TEM, CTX-M, PER i AmpC. Karakterizacija tipa ESBL učinjena je za ukupno 17 izolata; 4 izolata EC ESBL i 13 izolata KP ESBL.

Ukupno je 34 različitih ESBL gena utvrđen u 17 uključenih izolata: 10 (58.8%) su bili *bla*_{SHV} geni, 19 (52.9) su bili *bla*_{TEM} geni i 15 su bili *bla*_{CTX-M} geni (82.3%) (Tablica 18, Slika22). Amp C i PER nisu nađeni.

Slika 22. Karakterizacija beta-laktamaza.



Tablica 18. Karakterizacija beta-laktamaza.

Izolat	SHV		TEM		CTX-M	
	N	%	N	%	N	%
KP ESBL, N=15	8/13	61.5	7/13	53.8	13/13	100.0
EC ESBL, N=4	2/4	50.0	2/4	50.0	1/4	25.0
Ukupno, N=19	10/17	58.8	9/17	52.9	14/17	82.3

Petnaest od uključenih 17 izolata (88.2%) nosili su multiple ESBL gene (Tablica 19). Najčešće su izolati bili nosioci kombinacije gena $bla_{CTX-M} + bla_{TEM}$ (47.1%) i $bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$ (35.2%). Dva izolata KP ESBL bili su nosioci $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{TEM}$.

Tablica 19. Pripadnost beta laktamaza porodicama SHV, TEM, CTX-M, PER i AmpC određena lančanom reakcijom polimerazom.

Izolat	Broj izolata	Mjesto izolacije	SHV	TEM	CTX-M	PER	AmpC
EC	16	AT	-	+	+	-	-
EC	46	UK	+	+	-	-	-
EC	47	UK	+	-	-	-	-
EC	65	UK	+	-	-	-	-
KP	6	ŽS	-	+	+	-	-

KP	19	ŽS	+	-	+	-	-
KP	88	ŽS	+	-	+	-	-
KP	24	CVK	+	-	+	-	-
KP	79	UK	+	+	+	-	-
KP	83	UK	+	-	+	-	-
KP	124	HK	+	-	+	-	-
KP	125	HK	-	+	+	-	-
KP	127	HK	+	-	+	-	-
KP	4	ŽS	-	+	+	-	-
KP	43	AT	+	+	+	-	-
KP	117	UK	-	+	+	-	-
KP	129	AT	-	+	+	-	-

AT- aspirat traheje, UK- urinokultura, ZS- želučani sok, CVK- vrh centralnog venskog katetera, HK- hemkultura

RASPRAVA

Rezistencija bakterija na antibiotike sve je veći problem i danas predstavlja značajnu javnozdravstvenu prijetnju. Tome je dobra ilustracija problem produkcije beta-laktamaza proširenog spektra u enterobakterija, posebice u KP i EC, s obzirom da su ovi mikroorganizmi često multirezistentni na antibiotike te da samo karbapenemi za sada imaju dokazanu učinkovitost u liječenju infekcija ovim mikroorganizmima. Seleksijski pritisak primjene antibiotika smatra se značajnom determinantom nastanka i diseminacije rezistentnih organizama. Štoviše, primjena antibiotika je jedan od malobrojnih čimbenika rizika koji je podložan modifikaciji. Budući se antibiotici mogu razlikovati u svojoj sklonosti razvoja bakterijske rezistencije, od velikog je značenja razumijevanje složene interakcije između primjene antibiotika i nastanka i širenja rezistentnih bakterijskih sojeva. Problem izolacije ESBL sojeva posebno je prisutan u jedinicama intenzivne skrbi, koje su najčešće mjesta iz kojih se rezistentni sojevi bakterija moguće šire i u druge dijelove bolnice, druge ustanove ili u izvanbolničku sredinu. Osim povećane prevalencije izolacije ESBL sojeva, u JIL se općenito bilježi veća potrošnja antibiotika u odnosu na ostale dijelove bolnica. Čimbenici rizika za izolaciju ESBL soja ili ESBL infekciju dugo se istražuju različitim tipovima epidemioloških studija koje su pokušale kvantificirati povezanost između ekspozicije antibioticima i širenja ESBL sojeva. Te studije uključuju opise slučajeva, laboratorijske studije, prospektivne i retrospektivne kohortne studije, randomizirana klinička istraživanja, studije slučajeva sa kontrolama, i sl. Ove studije se obično temelje ili na skupnim podacima (tzv. ekološki dizajn studije) ili na individualnim podacima o bolesnicima (opis slučajeva, kohortne studije, *case-control* studije). Budući da različiti metodološki pristupi nisu međusobno usporedivi, nedostatak njihove uniformnosti otežava usporedbe različitih studija. Zbog toga je prepoznata potreba da se, ako je to moguće, u evaluaciji problema koristi paralelna analiza podataka koja uključuje i grupne podatke i podatke na razini bolesnika da bi se rezultati različitih metodoloških pristupa mogli usporediti. Nadalje, kao treća razina istraživanja, preporučuje se primjena metoda molekularne epidemiologije kojima bi se mogli utvrditi mehanizmi povezanosti, što se prije sveg odnosi na genotipizaciju izolata.

Do sada nije provedena studija koja bi obuhvatila sve tri navedene razine evaluacije problema izolacije ESBL sojeva KP i EC u jedinicama intenzivne skrbi.

Rezultati ovog trodijelnog straživanja u našoj ustanovi utvrdili su da je primjena antibiotika najvažniji rizični čimbenik za infekciju ESBL sojem KP i EC.

Ekološka studija koja je pratila trendove u ukupnoj potrošnji različitih skupina antibiotika u odabranim JIL u odnosu na mjesečnu učestalost izolacije ESBL sojeva utvrdila je značajnu povezanost potrošnje cefalosporina 3. generacije i flurokinolona s povećanjem učestalosti izolata ESBL sojeva sa vremenskim odmakom (kašnjenjem) od 2 mjeseca. Povezanost između potrošnje antibiotika i izolacije ESBL sojeva uočena je i za cefalosporine, aminoglikozide, vankomicin i klindamicin, no bez uočenog vremenskog odmaka. Dostupne studije koje su istraživale brzinu selekcije antimikrobne rezistencije ukazuju da treba očekivati određeno kašnjenje u učinku primjene antibiotika na razvoj rezistencije u bakterija^{134 218}. Taj vremenski odmak ili kašnjenje u učinku, u različitim studijama procijenjeno je na 10 dana do 6 mjeseci, a ovisi o uzročniku i tipu rezistencije^{219 220 253}. Za *P.aeruginosa* zabilježen je odmak od 10 dana do 1 mjesec u razvoju rezistencije na antipseudomonasne antibiotike, a za *K.pneumoniae* uočeni su različiti vremensko razdoblje potrebno za razvoj rezistencije, od 0-6 mjeseci za razvoj rezistencije na beta-laktamske antibiotike.

Na individualnoj razini, u *case-control* studiji, prethodna primjena antibiotika, dužina njihove primjene i njihov broj, specifično primjena fluorokinolona i makrolida te dužina boravka u JIL bili su najznačajniji čimbenici rizika za infekciju ESBL sojem KP ili EC. Studija molekularne biologije pokazala je kombinirano prisutnost epidemiološki povezanih ESBL i ne-ESBL sojeva KP i EC uz pojedinačne sojeve, bez slike značajnog klonalnog širenja u promatranom razdoblju.

U razdoblju provođenja studije koje je obuhvatilo 16 mjeseci i 3 JIL u KBC Zagreb na Rebru, učestalost izolacije ESBL sojeva KP i EC ukupno bila je 8.1%, pri čemu je učestalost izolacije KP ESBL bila značajno veća u odnosu na izolaciju EC ESBL (18.9% vs. 2.3%). Na razini ustanove (KBC Zagreb) u 2007. godini zabilježena je učestalost izolacije KP ESBL od 53% te EC ESBL od 7%.

Podaci za Republiku Hrvatsku koji su prijavljeni u sklopu projekta EARSS (*European Antibiotic Surveillance System*) za 2007. godinu, a obuhvatili su podatke iz 18 laboratorija kojima je obuhvaćeno oko 80% populacije Republike Hrvatske, ukazali su na veliku učestalost KP ESBL od 42.7% te puno nižu učestalost EC ESBL od

3.3%. Podaci iz KBC Zagreb i KBC Split prijavljeni za MYSTIC studiju (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) zabilježili su učestalost EC ESBL od 10% i učestalost KP ESBL od 49% u razdoblju od 2002-2007²²¹.

Učestalost izolata KP ESBL u Hrvatskoj mnogo je viša u odnosu na podatke iz većine studija koje uključuju europske podatke (SENTRY, SMART, TEST, MYSTIC, EARSS) koje su ukupnu učestalost izolacije KP ESBL procijenile na 8.8%-18.4%, a ukupnu učestalost izolacije EC ESBL na 1.3%-8.2% (Tablica 2). Međutim, studije koje uključuju samo podatke iz jedinica intenzivnih skrbi pokazuju značajno veću učestalost izolata ESBL sojeva, prvenstveno KP ESBL. Prevalencija izolata KP ESBL u JIL mnogo je viša u južnoj i istočnoj Europi (npr. 34% u Portugalu i 58% u Turskoj) u odnosu na sjever Europe (3% u Švedskoj)^{84 85 86}. To je u suglasju sa rezultatima praćenja programa ARPAC (Antibiotic Resistance, Prevention and Control) koji ukazuju na veću ukupnu potrošnju antibiotika u jugoistočnoj u odnosu na sjevernu Europu (15 DDD/100 BOD vs 30 DDD/100BOD)²²². Dok su u vrhu primjene u zemljama sjeverne Europe penicilini i cefalosporini 2. generacije, u zemljama južne i istočne Europe najviše se primjenjuju amoksicilin/klavulanska kiselina, aminoglikozidi i ciprofloksacin.

Izvešće EARSS studije za 2007. godinu ukazuje na veliku razliku u učestalosti KP i EC sojeva rezistentnih na 3. generaciju cefalosporina (indikativno za ESBL produkciju) prema zemljopisnom položaju²²³. Učestalost izolacije KP ESBL u zemljama sjeverne Europe bila je ispod 5% (Island 0%, Švedska 1%, Finska 1%, Norveška 2%, Luksenburg 2%) dok je u zemljama jugoistočne Europe bila >40% (Hrvatska 40%, Turska 44%, Češka 46%, Bugarska 55%, Grčka 62%, Rumunjska 80%). Ovo izvješće je također pokazalo da dok je u većini zemalja srednje, zapadne i sjeverne Europe (među njima i Hrvatska) rezistencija EC na 3. generaciju cefalosporina (indikativno za ESBL produkciju) ispod 5%, u mnogim zemljama je ona alarmantna, npr. 20% u Bugarskoj, 28% u Rumunjskoj i 40% u Turskoj. Razlozi niže prevalencije izolacije ESBL KP i EC u našoj studiji mogu se pripisati neuključivanju ostalih JIL (kirurška, kardiokirurška, urološka) u ovo istraživanje u kojima je učestalost izolacije ESBL sojeva veća. U ovim je JIL u razdoblju ispitivanja zabilježena ukupna učestalost izolacije ESBL KP i EC sojeva od 35% (ESBL EC 14% i KP ESBL 50%)..

Rizik primjene antibiotika za razvoj infekcije ESBL sojem KP i EC

Ekološkom studijom (skupni podaci) procijenjen je ekološki pritisak primjene antibiotika na selekciju ESBL sojeva u odabranim JIL. U daljnjoj analizi dobiveni rezultati su provjereni na individualnoj razini u *case-control* studiji koja je obuhvatila isto razdoblje ispitivanja i jedinice intenzivne skrbi.

Najpropisivaniji antibiotici 2006. godine u odabranim JIL bili su penicilini (43.6 DDD/100 BOD), cefalosporini (27.7 DDD/100 BOD; cefalosporini 3. generacije 4.4 DDD/100 BOD), kombinacije beta-laktamskih antibiotika/inhibitora beta-laktamaze (21.9 DDD/100 BOD), karbapenemi (16.3 DDD/100 BOD), aminoglikozidi (11.7 DDD/100 BOD), i fluorokinoloni (11.1 DDD/100 BOD).

U razdoblju od 2006.- 2008. godine zabilježen je porast potrošnje svih antibiotika u odabranim JIL osim aminoglikozida čija je potrošnja ostala ista. Najveći rast potrošnje zabilježen je za klindamicin (58%), fluorokinolone (47%), cefalosporine 3. generacije (43%) i kombinacije beta-laktama/inhibitora beta-laktamaza (38%) (Tablica 4), dok su penicilini zabilježili porast potrošnje od 33%.

Evaluacija podataka na individualnoj razini utvrdila je da su bolesnici s infekcijom ESBL sojem znatno duže bili hospitalizirani u JIL (27 dana vs 14 dana). Pri tom im je bilo propisano značajno više antibiotika (3 antibiotika vs 2 antibiotika) te su znatno duže liječeni antibioticima u odnosu na kontrolne slučajeve (19 dana vs 11 dana). Nadalje, značajno više bolesnika s ESBL infekcijom primalo je antibiotike prije izolacije uzročnika (70% vs 33%) a isto tako su i prethodno bili liječeni sa značajno većim brojem antibiotika. Dužina hospitalizacije u JIL koja je prethodila izolaciji uzročnika bila značajnije duža (8 dana vs 2 dana). Značajno više bolesnika s infekcijom ESBL sojem prethodno je primalo flurokinolone (19% vs 5%) i azitromicin u odnosu na kontrole (16% vs 2%). Prethodna primjena amoksicilina i klavulanske kiseline također je bila viša u ESBL skupini u odnosu na kontrolnu, iako ta razlika nije rezultirala statističkom značajnošću (19% vs. 6%, $p=0.067$).

Izračun omjera izgleda jasno je utvrdio kako je prethodna primjena antibiotika [OR 4.5 (1.8-11.2), $p=0.001$], a posebno prethodna primjenu fluorokinolona [OR 4.7 (1.08-20.2), $p=0.056$] i makrolida [OR 11.7 (1.3-104.7), $p=0.015$] značajan čimbenik rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC. Povišenje rizika od infekcije ESBL sojem također je bilo povezano i s brojem prethodno primijenjenih antibiotika [OR 1.4 (1.1-

1.9), $p=0.003$], kao i dužinom njihove primjene [OR 1.1 (1.02-1.2), $p=0.001$] te dužinom hospitalizacije u JIL prije izolacije uzročnika [OR 1.1 (1.01-1.11), $p=0.005$]. Dosadašnja istraživanja utvrdila su da prethodna antimikrobna terapija i broj prethodno primijenjenih antibiotika povećavaju rizik za infekciju ili kolonizaciju ESBL sojevima KP i EC¹⁵⁴. Brojni su radovi koji su utvrdili povećanu prevalenciju izolata ESBL uz primjenu pojedinih antibiotika. Tako su objavljena istraživanja utvrdila povezanost primjene cefalosporina^{154 147 224}, beta-laktamskih antibiotika/inhibitora beta-laktamaze¹⁴⁸, karbapenema¹⁵⁴, fluorokinolona^{154 148} i aminoglikozida¹⁵⁴ s povećanim brojem izolata ESBL sojeva.

Ova provedena ekološka studija potvrdila je rezultate većine objavljenih studija identificirajući značajni učinak potrošnje cefalosporina ukupno te cefalosporina 3. generacije, na učestalost izolacije ESBL sojeva. Za ovaj učinak utvrđen je vremenski odmak od 2 mjeseca za cefalosporine 3. generacije, dok je taj učinak za cefalosporine kao skupinu bio bez kašnjenja (bez identificiranog vremenskog odmaka). U razdoblju od 2006.- 2008. godine zabilježen je porast relativne potrošnje cefalosporina 3. generacije od 43% u uključenim JIL. Unatoč činjenici da su mnoge *case-control* studije povezale prethodnu primjenu cefalosporina 3. generacije sa selekcijom ESBL sojeva KP i EC, primjena cefalosporina (ukupno i cefalosporina 3. generacije) nije se u ovoj *case-control* studiji pokazala značajnim predskazateljem za izolaciju ESBL soja. Mogući razlog tomu je restrikcija primjene cefalosporina 3. generacije na KBC Zagreb i time njihova kontrolirana i reducirana primjena kod sumnje na infekcije enterobakterijama posebice u duže hospitaliziranih bolesnika u JIL. Ovakav rezultat moguće upućuje na neželjeni učinak ukupne primjene cefalosporina 3. generacije na učestalost izolacije ESBL sojeva (kolateralna šteta primjene antibiotika), unatoč tome što je mali broj bolesnika s ESBL infekcijom u našoj studiji bio prethodno izložen njihovoj primjeni. Udio cefalosporina 3. generacije u ukupnoj potrošnji cefalosporina iznosio je samo 16% u 2006. godini (Tablica 4). Drugi mogući razlog jest veličina uzorka koja moguće nije bila dovoljna da otkrije ovu povezanost. Zbog fenotipa rezistencije ESBL sojeva cefalosporini se ne smatraju izborom u liječenju infekcija ESBL sojevima, čak i u slučaju laboratorijske osjetljivosti soja na specifičan cefalosporinski antibiotik. Zdravstvene djelatnike treba upozoravati da laboratorijska osjetljivost ne predstavlja nužno kliničku djelotvornost. Studija Kanga i suradnika koja je istraživala čimbenike rizika za mortalitet kod bakterijemije uzrokovane ESBL KP i EC utvrdila je da je terapijska

primjena cefalosporina važan čimbenik rizika za smrtni ishod u bolesnika s bakterijemijom ESBL sojem KP i EC (OR 6.8, 95%CI 2.8-16.5)²⁴⁸.

Ekološkom studijom utvrđen je značajan učinak potrošnje fluorokinolona na učestalost izolacije ESBL sojeva uz vremenski odmak 2 mjeseca. Primjenu fluorokinolona kao rizični čimbenik potvrdila je i *case-control* studija (OR 4.7, 95% CI 1.1-20.2, p=0,05). Primjena flurokinolona poznati je čimbenik rizika za izolaciju gram-negativnih bakterija rezistentnih na flurokinolone, djelom i zbog njihovog snažnog utjecaja na gastrointestinalnu floru što uključuje supresivno djelovanje na gram-negativne fakultativne bakterije, a taj učinak je mnogo snažniji i duži u odnosu na druge antibiotike²²⁵. Niz je dobro kontroliranih studija potvrdilo značajnu rezistenciju na fluorokinolone u ESBL sojeva te pokazale značajnu povezanost prethodne ekspozicije flurokinolonima i izolacije ili infekcije ESBL sojevima KP i EC¹⁴³. Studija Rodriguez-Bano i suradnika identificirala je primjenu flurokinolona te kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze kao čimbenike rizika za bakterijemiju ESBL EC¹⁷⁹. Činjenica da je primjena fluorokinolona čimbenik rizika za infekciju ESBL sojem zabrinjavajuća je, budući da se globalno, posebno u izvanbolničkoj populaciji bolesnika, bilježi povećana primjena fluorokinolona²²⁶.

I u našoj ustanovi se u promatranom razdoblju bilježi vrlo visoki relativni porast potrošnje fluorokinolona od 47% što se može tumačiti nepostojanjem ograničavanja u primjeni (Tablica 4). Općenito je zabilježena znatno veća učestalost rezistencije ESBL sojeva na fluorokinolone, posebice KP, u odnosu na enterobakterije koje ne produciraju ESBL. U dvije najveće relevantne studije koje su proučavale ishode terapije ESBL bakterijemija, jedna studija dala je prednost karbapenemima, dok je druga studija našla sličnu učinkovitost primjene karbapenema i fluorokinolona u liječenju ESBL bakterijemija^{173 248}. Iako je ciljane antimikrobna terapija pokazala povoljan učinak na preživljenje u bolesnika s bakterijemijom uzrokovanom sojevima KP i EC ESBL osjetljivim na flurokinolone²⁴⁸, problem je sve veća rezistencija ESBL sojeva na ovu skupinu antibiotika. U našoj studiji je rezistencija ESBL KP na fluorokinolone bila 54%, dok uključeni sojevi ESBL EC nisu bili rezistentni na kinolone. Ovi rezultati podudaraju se s podacima iz studije koja je evaluirala učestalost ESBL KP i EC izolata sa područja Hrvatske u približno istom razdoblju (oko 50% rezistencije ESBL KP na flurokinolone)¹⁰³. Danas se procjenjuje da je globalno više od 50% ESBL KP i EC rezistentno na flurokinolone²²⁷. Nadalje, u jednoj multicentričnoj studiji koja je uključila bolesnike s bakterijemijom uzrokovanom

KP, 60% izolata koji su bili rezistentni na ciprofloksacin producirali su i ESBL¹⁹¹. U studiji Wenera i suradnika, 95% izolata KP ESBL bilo je rezistentno na fluorokinolone u odnosu na 18% izolata KP koji nisu producirali ESBL¹⁴³.

Prisutnost više tipova ESBL uz deficijenciju vanjskog membranskog proteina može dovesti do rezistencije ESBL producirajućih enterobakterija na kombinacije beta-laktamskih antibiotika i beta-laktamaza⁶². Ova ekološka studija nije pokazala značajnu povezanost potrošnje piperacilina/tazobaktama, amoksicilina/klavulanske kiseline ili općenito cijele skupine beta-laktamskih antibiotika s inhibitorima beta-laktamaza s učestalošću izolata ESBL sojeva. U ovom istraživanju zabilježena je rezistencija ESBL KP i EC na kombinaciju piperacilina/tazobaktama od 62%. Zabilježena učestalost sojeva rezistentnih na piperacilin/tazobaktam na razini Hrvatske u istom razdoblju bila je oko 30% RH¹⁰³. Na kombinaciju ampicilina i sulbaktama rezistencija je bila uočena u svih izolata KP ESBL te u 25% izolata EC ESBL. U Hrvatskoj je zabilježena rezistencija na ampicilin i sulbaktam u KP od 27% u 2007.godini¹⁰².

U ovoj *case-control* studiji zabilježena je veća prethodna primjena amoksicilina/klavulanske kiseline u bolesnika s posljedičnom ESBL infekcijom KP i EC u odnosu na kontrole (19% vs 6%, $p=0.067$), no izračun omjera izgleda nije rezultirao potvrdom primjene ovog antibiotika kao rizičnog čimbenika za ESBL infekciju (OR 3.4, 95% CI 0.9-13.2). Prethodna primjena piperacilina/tazobaktama bila je slična u obje ispitivane skupine. U studiji Wenera i suradnika koji su koristili *case* (bolesnici s izolatom KP ESBL)-*case* (bolesnici s izolatom ne-ESBL KP)-*control* (hospitalizirani bolesnici) dizajn studije, prethodna primjena kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze bila je značajno povezana s izolacijom ESBL soja KP u hospitaliziranih bolesnika¹⁴³. Štoviše, u ovoj studiji je primjena kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze bila najsnažniji čimbenik rizika (OR 10.2; 95%CI 1.2-86.9), a rezistencija na ovu skupinu antibiotika bila je prisutna u oko 50% izolata KP ESBL. Inhibitori beta-laktamaze u kliničkoj primjeni (klavulanska kiselina, sulbaktam i tazobaktam) pripadaju Ambler klasi A enzimskih inhibitora, no ESBL producirajući sojevi u najvećem dijelu svijeta pokazuju visoku rezistenciju na kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze. Ta činjenica se najčešće objašnjava prisutnošću gena za OXA enzime (koji nisu inhibirani Amblerovom klasom A enzimskih inhibitora) na ESBL plazmidu, hiperprodukcijom ESBL enzima, istodobnom prisutnošću AmpC beta-

laktamaza, potencijalno u kombinaciji s mutacijama porinskih kanala, ili, manje često u kombinaciji mutacije samog gena za ESBL (npr. složena mutacija TEM beta-laktamaze)¹⁵⁶. Zabilježena je pojava rezistencije i neuspjeha terapije ESBL infekcija kombinacijama beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze²⁶². Studije utjecaja prethodne primjene kombinacije beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze na rizik izolacije ESBL soja su pokazale različite rezultate. Neka istraživanja upravo obrnuto ukazuju na mogući protektivni učinak prethodne primjene navedenih antibiotika u odnosu na izolaciju ESBL soja²²⁸, no veći broj utvrđuje njihovu primjenu kao značajan čimbenik rizika^{143 144}. Ove razlike mogu biti posljedica razlika u zemljopisnoj učestalosti specifičnih tipova ESBL, istodobne rezistencije prema drugim antibioticima, razlikama u lokalnim propisivačkim navikama te razlikama u dizajnu studija. I na temelju ove studije koja je obuhvatila ekološke i individualne podatke ne može se sa sigurnošću odrediti mjesto primjene beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaze kao rizičnog čimbenika za izolaciju ESBL soja.

Ekološki dio ovog istraživanja utvrdio je značajnu povezanost potrošnje aminoglikozida s učestalošću izolata ESBL sojeva. U razdoblju od 2006. – 2008. godine aminoglikozidi su bili jedina skupina antibiotika za koju nije zabilježen značajni porast potrošnje (vidi Tablicu 4), što se može najvećim dijelom pripisati utjecaju povećane kontrole propisivanja aminoglikozida u JIL te preporuci da se aminoglikozidi ne propisuju shematski u kombinaciji sa beta-laktamskim antibioticima. Takvo propisivanje predstavlja običaj što s obzirom na rastuću rezistenciju gram-negativnih bakterija na aminoglikozide zahtijeva strožiji nadzor. Unatoč utvrđene povezanosti u ekološkoj studiji, u *case-control* studiji prethodna primjena aminoglikozida nije se pokazala rizičnim čimbenikom za posljedičnu infekciju ESBL sojem KP i EC. Kako je već navedena visoka rezistencija ESBL sojeva na aminoglikozide, oni se ne smatraju antibioticima izbora u liječenju ESBL infekcija. Visoku rezistenciju ovih sojeva na aminoglikozide smo utvrdili i u našem istraživanju, pri čemu su ESBL izolati bili najosjetljiviji na amikacin (KP ESBL 15% i EC ESBL 25%) (vidi tablicu 13). Ti rezultati su u skladu sa podacima o smanjenoj rezistenciji ESBL sojeva na aminoglikozide i u drugim dijelovima svijeta, koja se bilježi posebno kod izolata KP ESBL a iznosi od 63-77%²²⁹. Kontrolirane studije povezuju primjenu aminoglikozida s povišenim rizikom kolonizacije i infekcije ESBL sojevima KP i EC^{154 230}. Klinički podaci koji bi dokazali učinkovitost terapije ESBL

infekcija aminoglikozidima su ograničeni. U studiji Kanga i suradnika bio je uočen povišeni mortalitet bolesnika liječenih aminoglikozidima u ciljanoj terapiji u odnosu na bolesnike liječene fluorokinolonima ili karbapenemima²⁴⁸.

Ekološka studija nije povezala promjene u potrošnji makrolida sa promjenama u učestalosti izolata ESBL sojeva. Makrolidi do sada nisu opisani kao antibiotici povezani s povišenim rizikom od izolacije ESBL soja, no u *case-control* studiji prethodna primjena makrolida bila je najjači čimbenik rizika u odnosu na druge antibiotike (OR 11.7, 95%CI 1.3-104.7). U literaturi nema objavljenih studija koje su identificirale makrolide kao rizični čimbenik za izolaciju ili infekciju ESBL sojem. Makrolidi su u ovom istraživanju u uključenim JIL zabilježili relativni porast u potrošnji od 33% u razdoblju od 2006. do 2008. godine, moguće zbog izdavanja Smjernica za antimikrobnu terapiju 2006.godine. Prema smjernicama za KBC Zagreb u liječenju izvanbolničkih pneumonija koje zahtijevaju hospitalizaciju preporučuje se kombinacija beta-laktamskog antibiotika i makrolida. Daljnje su studije potrebne da potvrde ili opovrgnu ovu povezanost.

U studiji ekološkog učinka primjene antibiotika, karbapenemi nisu bili povezani sa učestalošću izolata ESBL KP i EC. Kako su karbapenemi antibiotici izbora u liječenju ESBL infekcija, povećana potrošnja karbapenema se može očekivati uz povećanu učestalost izolata ESBL sojeva što može predstavljati samo odraz povećane učestalosti izolata ESBL sojeva, bez utjecaja na samu selekciju ESBL sojeva. Zadnjih godina opisuje se rezistencija ESBL KP na karbapeneme uzrokovana produkcijom karbapenemaza, no zabilježeni su i drugi mehanizmi rezistencije. Zapažena je veća učestalost rezistencije enterobakterija na ertapenem u odnosu na ostale karbapeneme (meropenem, imipenem/cilastatin) što je posljedica biološki lakše ostvarive rezistencije na ertapenem, budući da je za nju potrebna produkcija ESBL uz nepropusnost uzrokovanu promjenama u porinskim kanalima²⁵². Međutim, zabilježena je mogućnost nastanka rezistencije KP i na imipenem koja nije uzrokovana produkcijom karbapenemaza, već produkcijom ESBL i AmpC uz promjene u porinskim kanalima²⁵³. U Hrvatskoj je u 2007.²³¹ i u 2008. godini (dr.sc. Z. Bošnjak, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Zagreb, osobna komunikacija) zabilježen po jedan soj KP rezistentan na karbapeneme. No, s obzirom na povećanje potrošnje karbapenema (30% u razdoblju od 2006.-2008. godine) može se nažalost očekivati porast prevalencije rezistentnih izolata. Dodatno, povećana primjena karbapenema u liječenju ESBL

infekcija povezana je s povećanom prevalencijom rezistencije drugih nozokomijalnih gram-negativnih bakterija na karbapeneme, kao što su *P.aeruginosa* i *Acinetobacter* spp.^{202 203 204}.

U ekološkoj studiji još je primjena klindamicina i vankomicina bila povezana s učestalošću izolata ESBL sojeva u promatranim JIL. Ova povezanost nije potvrđena u *case-control* studiji. Nema objavljenih studija koje povezuju primjenu vankomicina i klindamicina s povišenim rizikom izolacije ESBL sojeva. Istraživanja su pokazala da je očuvana anaerobna mikroflora bitna u sprječavanju kolonizacije enterobakterijama kao što je *K.pneumoniae* ESBL. Na životinjskim modelima je dokazano da antibiotici koji imaju značajan utjecaj na intestinalne anaerobe, a nemaju značajan antibakterijski utjecaj na ESBL bakterije, potiču kolonizaciju ESBL sojevima (npr. klindamicin, vankomicin)²³². Prospektivna kohortna studija Harrisa i suradnika koja je uključila oko 5000 bolesnika iz kirurške i internističke JIL, utvrdila je da prethodna primjena piperacilina i tazobaktama te vankomicina predstavlja značajan rizik za kolonizaciju ESBL sojevima KP i EC¹⁴⁴. S obzirom na nisku intestinalnu koncentraciju piperacilina/tazobaktama i ovisnost o učinku inokuluma, smatra se da bi primjena ovog antibiotika mogla podržavati kolonizaciju i prijenos ESBL sojeva enterobakterija, ali bi mogla spriječiti nastanak kolonizacije u „ESBL naivnih“ bolesnika zbog ograničenog no ipak prisutnog učinka tazobaktama na ESBL.

Epidemiološka povezanost sojeva

U novije vrijeme *case-control* ili kohortne studije koje se bave proučavanjem čimbenika rizika za kolonizaciju i infekciju ESBL sojevima uključuju i metode molekularne epidemiologije svih ili reprezentativnog broja izolata što omogućava točniju interpretaciju povezanosti utvrđenih u kliničkim studijama^{224 233}. Naime, vrlo je važno identificirati pravi uzrok povećanju prevalencije ESBL izolata kako bi se poduzele odgovarajuće ciljane mjere. Ukoliko su izolati ESBL pripadnici raznovrsnih skupina prema genetičkoj sličnosti, zaključujemo da je osnovni uzrok navedenih negativnih pojava preširoka primjena antibiotika, posebice onih za koje se zna da imaju utjecaj na selekciju ESBL sojeva. Ukoliko se radi o izolatima koji pripadaju istoj ili malobrojnim genetički sličnim skupinama (engl. *clonal outbreak*), pažnja se prije svega mora usmjeriti intenziviranju i pridržavanju mjera kontrole infekcije, koje uključuju izolaciju bolesnika, usmjeravanje pažnje na pridržavanje osnovnih mjera

kao što su dezinfekcija ruku, stetoskopa i sl. te u slučaju epidemijske situacije, zatvaranje odjela. Oba problema mogu biti prisutna istodobno.

U našem istraživanju učinjena je PFGE genotipizacija i karakterizacija beta-laktamaza reprezentativnog broja izolata ESBL i ne-ESBL sojeva KP i EC. U studiju molekularne epidemiologije uključeno je 100% (4/4) uzoraka EC ESBL i 44% (14/32) uzoraka KP ESBL. Ovaj dio istraživanja uključio je i 24% (73/307) uzoraka EC i 32% (54/169) uzoraka KP. Analiza dendrograma pokazala je sličnu epidemiološku sliku za ESBL i ne-ESBL sojeve, uz manje skupine epidemiološki povezanih izolata, no ipak pokazujući relativnu raznovrsnost. Ukupno 72 izolata KP za koje je učinjena genotipizacija svrstano je u 28 različitih skupina sa 1-7 izolata u svakoj. Ukupno je 14 izolata KP ESBL svrstano u 7 različitih skupina sa 1-4 izolata u svakoj. Ukupno 77 izolata EC razvrstano je u 34 različite skupina sa 1-4 uzorka u svakoj. Ukupno je 4 izolata EC ESBL svrstano u 3 različite skupine; jedna skupina sadržava 2 izolata sa 82%-tnom sličnosti koji vjerojatno nisu epidemiološki povezani.

Značajno grupiranje izolata ukazuje na problem prijenosa uzročnika s bolesnika na bolesnika ili diseminaciju iz istog izvora (npr. kontaminirana oprema, zdravstveni djelatnik). U bolničkim sredinama je zabilježeno da se genetički identični uzročnici mogu pojaviti u različitim vremenskim razdobljima, u drugoj JIL i u drugom uzorku¹⁶⁰. Rezultati PFGE genotipizacije u ovom istraživanju pokazuju da je uz selekcijski pritisak antibiotika, također i horizontalni prijenos uzročnika mogući problem. To zahtijeva pojačanje i nadzor osnovnih mjera za kontrolu infekcije. Grupiranje izolata utvrđeno u našem istraživanju ipak ne govori u prilog epidemijskoj situaciji. Budući je 20 ESBL izolata bilo iz 10 različitih skupina prema genetičkoj sličnosti s maksimalno 4 izolata po skupini, možemo zaključiti kako je primjena antimikrobnih lijekova imala važnu ulogu u selekciji ESBL sojeva KP i EC u odabranim JIL, stoga je modifikacija i nadzor antimikrobne terapije u JIL potrebna i korisna mjera. Ipak, uočena je skupina od 5% genetički sličnih izolata EC i skupina od 10% genetički sličnih izolata KP što govori u prilog istodobnom horizontalnom prijenosu uzročnika u JIL. To nadalje zahtijeva dodatne napore za bolju kontrolu kojom se može spriječiti diseminacija rezistentnih uzročnika.

Dok su prethodne studije ukazivale da je u bolničkim ESBL infekcijama najučestaliji tip ESBL SHV i TEM⁴⁴, novije studije ukazuju na povećanu prevalenciju CTX-M enzima koja je danas najčešći tip ESBL⁵¹. U našoj studiji je karakterizacija beta-laktamaza također ukazala na najveću prevalenciju izolata koji su nosioci bla_{CTX-M}

(82%), uz sličnu prevalenciju gena bla_{SHV} (59%) i bla_{TEM} (53%). Petnaest od uključenih 17 izolata (88%) nosili su multiple ESBL gene. Najčešće su izolati bili nositelji kombinacije gena $bla_{CTX-M} + bla_{TEM}$ (47%) i $bla_{CTX-M} + bla_{SHV}$ (35%). Tri izolata KP ESBL bili su nositelji $bla_{CTX-M} + bla_{SHV} + bla_{TEM}$. Velika učestalost izolata koji su nosioci gena za više tipova ESBL upućuje na složen fenotip rezistencije, i ograničenje u mogućnosti primjene kombinacije beta-laktamskih antibiotika sa inhibitorima beta-laktamaze i eventualno cefepima u liječenju ovih infekcija. U do sada objavljenim studijama molekularne epidemiologije učestalost bolničkih ESBL izolata sa više tipova ESBL bila je 19.2%⁴⁴.

U našem istraživanju nisu među izolatima ESBL nisu nađeni geni za PER i AmpC beta-laktamaze u uzorcima uključenim u ovaj dio studije. Plazmidom prenosivi AmpC enzimi u ESBL producirajućih sojeva u međuvremenu postaju veliki problem, budući testovi potvrde ESBL često ne identificiraju izolate s AmpC beta-laktamazom²³⁴. To može dovesti do propisivanja neadekvatne terapije cefepimom ili kombinacijom beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze s obzirom na njihovu rezistenciju na inhibitore beta-laktamaza^{76 235}. U Hrvatskoj AmpC beta-laktamaze još nisu opisane.

Rizici neadekvatne empirijske terapije infekcije ESBL sojem KP i EC

Istraživanja su pokazala da je ESBL produkcija u enterobakterija važan prediktor neadekvatne empirijske terapije, a procjenjuje se da je udio neadekvatne inicijalne terapije kod ESBL infekcija od 43.4%-66%^{146 236 237 238}. Više je neovisnih prediktora neadekvatne inicijalne antimikrobne terapije: ESBL producirajući soj, prethodna hospitalizacija, prethodna terapija antibioticima i bakterijemija nepoznatog uzroka¹⁴⁶. Većini bolesnika (oko 85%) u obje skupine uključene u *case-control* studiju empirijska antimikrobna terapija započeta je prije pristizanja antibiograma. Pritom je učestalost neadekvatne empirijske antibiotske terapije bila je značajno viša u skupini bolesnika s ESBL infekcijom u odnosu na kontrolnu grupu (73% vs. 9%, $p < 0,001$), što u potpunosti odgovara podacima iz prethodno navedenih objavljenih studija. Mnoge studije su povezale neadekvatnu inicijalnu antimikrobnu terapiju s povećanim mortalitetom bolesnika u ICU. U studiji Ibrahima i suradnika, u skupini bolesnika s bakterijemijom liječenih neadekvatnom empirijskom antimikrobnom terapijom u

internističkoj ili kirurškoj JIL, zabilježen je znatno viši mortalitet (62%) u odnosu na bolesnike liječene adekvatnom empirijskom antimikrobnom terapijom (28%)²³⁹. Odgođena primjena učinkovite antibiotske terapije ima znatan učinak na ishode liječenja bolesnika. Studija Tumbarela i suradnika je proučavala čimbenike rizika za propisivanje neadekvatne inicijalne antimikrobne terapije u bolesnika s bakterijemijom ESBL EC. U skupini bolesnika liječenih neadekvatnom empirijskom antibiotskom terapijom 21-dnevni mortalitet bio je više od 4 puta veći u odnosu na skupinu liječenih adekvatnim antibioticima (52% vs. 11%). Najvažniji prediktor mortaliteta u ovoj studiji bila je neadekvatno propisana empirijska antibiotska terapija¹⁴⁶. Studija Kanga i autora nije uspjela dokazati povezanost neadekvatne empirijske terapije s povećanim mortalitetom u bolesnika s bakterijemijom ESBL sojem KP i EC. Međutim, neadekvatna terapija infekcije, posebice terapija cefalosporinima (čak i u slučajevima osjetljivosti ESBL soja na cefalosporine), bila je povezana s povećanjem mortaliteta²⁴⁸.

Ukupni mortalitet u našoj studiji bio je veći u bolesnika s ESBL infekcijom u odnosu na bolesnike s infekcijom običnim sojem KP ili EC, iako ova razlika nije rezultirala u statističkoj značajnosti (22% vs. 14%, $p=0.34$). Međutim, mortalitet vezan uz infekciju bio je značajno viši u ESBL grupi (29%) u odnosu na kontrolnu grupu u kojoj uzrok niti jedne smrti u bolesnika nije bila infekcija. U skupini bolesnika sa ESBL infekcijom 4/7 bolesnika (57%) nije primalo adekvatnu terapiju u vrijeme smrti. Istodobno, nismo utvrdili bolesnike u kontrolnoj skupini s neadekvatnom terapijom. Naši rezultati koji govore u prilog povezanosti neadekvatne antibiotske terapije i povišenog mortaliteta u suglasju su s prethodnim objavljenim studijama.

Ostali rizični faktori

Podaci iz objavljenih studija o povezanosti komorbiditeta i različitih intervencija uz kolonizaciju i infekciju ESBL sojevima različiti su i uključuju teži klinički status (APACHE II score), invazivne postupke (urinarni kateter, endotrahealna intubacija, centralna venska linija) ili kirurški zahvat, hemodijalizu, diabetes mellitus, prisutnost nazogastrične sonde, gastrostome ili jejunostome, dekubitalne rane, neadekvantu prehranu, malignu bolest, hematološku malignu bolest, bolest jetre, pluća ili bubrega te mehaničku ventilaciju^{143 178 179 180 181 182}. No, primjerice studija Cordery i suradnika provedena u JIL također nije identificirala niti jedan individualni rizični čimbenik za ESBL infekciju²⁴⁰. Tijekom istraživanja u ovoj *case-control* studiji niti jedan od

promatranih rizičnih čimbenika (komorbiditet, intervencije) nije se pokazao značajnim predskazateljem za infekciju ESBL sojem KP i EC.

Ovakva raznolikost u podacima o komorbiditetu, odnosno intervencijama koje predisponiraju za ESBL infekciju, vjerojatno se može objasniti razlikama u dizajnu studija, no u našoj studiji ne može se isključiti niti mogućnost da je broj uključenih bolesnika bio nedovoljan da bi otkrio povezanost promatranih čimbenika rizika s infekcijom ESBL sojem KP i EC. No, teško je odgovoriti na pitanje da li su identificirani čimbenici rizika u gore navedenim studijama samo obilježja bolesnika hospitaliziranog u JIL, koji na taj način ima i značajno veću mogućnost za produljenom hospitalizacijom i primjenom antimikrobne terapije, što su jasno ustanovljeni čimbenici rizika za ESBL infekciju.

Nadzor primjene antibiotika

U liječenju ozbiljnih ESBL infekcija antibiotici izbora su karbapenemi čija je potrošnja također zabilježila znatan relativan rast (30%) u promatranom razdoblju (vidi tablicu 4). Međutim, preširoko propisivanje karbapenema u JIL nije pravi način spriječavanja morbiditeta i mortaliteta od ESBL infekcija. Povećana potrošnja karbapenema, iako do sada nije sa sigurnošću povezana s povećanim rizikom izolacije ESBL sojeva EC ili KP, povezana je s razvojem rezistencije drugih uzročnika na karbapeneme, kao što su *P.aeruginosa* i *A.baumannii*, koji su također značajni uzročnici bolničkih infekcija. Iako rijetki, već su i u Hrvatskoj sporadično otkriveni sojevi ESBL koji su rezistentni na karbapeneme¹⁰². U 2007.godini otkriven je jedan izolat KP ESBL rezistentan na ertapenem¹⁰². Unatoč, ili upravo zbog toga, što u Hrvatskoj još nemamo značajnih problema s ESBL sojevima rezistentnim na karbapeneme, važna je njihova racionalna primjena sada. Poznato je da je rano propisivanje adekvatnog antibiotika ključno za preživljenje sepse u JIL²⁴¹. Karbapenemi se u JIL smatraju idealnim antibioticima u bolesnika sa znacima sepse. Nažalost, manje iskusan kliničar koji propisuje antibiotike može smatrati da su karbapenemi idealni u svakog bolesnika s kompliciranom infekcijom ili potencijalno rezistentnim patogenom. Neizbježno je da preširoko propisivanje karbapenema dovede do povećanog selekcijskog pritiska za razvoj rezistentnih *P.aeruginosa* i *Acinetobacter* sojeva, s obzirom na njihovu poznatu visoku osjetljivost na karbapeneme. Zabilježene kliničke studije karbapenem-rezistentnih KP i EC pokazale su povećanje smrtnosti u bolesnika s infekcijom karbapenem rezistentnim sojevima (14-dnevni mortalitet

47%)²⁴². Za razliku od relativno niske prevalencije karbapenemaza-producirajućih sojeva koji su rezistentni na sve karbapeneme, češće se nalaze enterobakterije rezistentne na ertapenem što odražava činjenicu da je biološki jednostavnije razviti rezistenciju na ertapenem u odnosu na druge karbapeneme²⁴³. Među izolatima KP je također otkrivena mogućnost razvoja rezistencije na imipenem koja je odraz produkcije više ESBL, AmpC beta-laktamaza i promjena u propusnosti vanjske membrane, a ne produkcije karbapenemaza²⁵³.

Pozitivni rezultati studija koje su proučavale primjenu fluorokinolona u liječenju ESBL infekcija pokazale su da bi se oni mogli smatrati antibioticima izbora u liječenju infekcija osjetljivim ESBL sojevima, no u međuvremenu uočena visoka učestalost rezistencije ESBL sojeva na fluorokinolone (>50%) bitno ograničava njihovu primjenu i u empirijskoj i ciljanoj terapiji ovih infekcija. Nadalje, ova skupina antibiotika jasno je povezana s povišenjem rizika od infekcije ESBL sojem EC i KP, što je utvrđeno i u ovom istraživanju i na ekološkoj i individualnoj razini. Skupina antibiotika koja se može primijeniti u liječenju infekcija urinarnog trakta osjetljivim ESBL sojevima su aminoglikozidi. No, visoka prevalencija rezistencije ESBL sojeva na sve aminoglikozide u našem istraživanju ograničava ozbiljnu primjenu aminoglikozida u liječenju infekcija ESBL sojevima KP i EC u JIL.

Visoka učestalost rezistencije ESBL KP i EC na piperacilin/tazobaktam (62% i 75%) i ceftazidim (100% i 75%) u našem istraživanju ograničava primjenu ovih antibiotika u ESBL infekcijama. Ovi antibiotici mogli bi biti izbor antibiotika u osjetljivih ESBL sojeva u liječenju urinarnih infekcija (bez znakova sepse), posebno ukoliko se radi o izvanbolničkim izolatima EC ESBL u kojih se najčešće nalazi CTX-M tip beta-laktamaze koji je osjetljiviji na djelovanje navedenih antibiotika u odnosu na SHV i TEM tip ESBL. No, bolnički izolati često produciraju više tipova ESBL koji mijenjaju fenotip rezistencije i čine kombinacije beta-laktamskih antibiotika s inhibitorima beta-laktamaza i cefepim manje učinkovitima. U našem istraživanju čak je 88% ESBL izolata nosilo je multiple ESBL gene.

S obzirom na povećan mortalitet bolesnika s ESBL infekcijom liječenih neadekvatnom empirijskom antimikrobnom terapijom, naponi usmjereni smanjivanju učestalosti primjene neadekvatne empirijske antimikrobne terapije mogli bi poboljšati ishode liječenja bolesnika. Rello i suradnici ukazali su na činjenicu da se patogeni odgovorni za nozokomijalne infekcije u JIL često razlikuju između bolnica²⁴⁴. To naglašava potrebu za poznavanjem lokalne mikrobne flore odgovorne za infekcije,

kao i za poznavanjem čimbenika rizika za ove infekcije, što bi moglo smanjiti učestalost neadekvatnog propisivanja empirijske antimikrobne terapije i omogućiti izbor najučinkovitijeg antibiotika.

Kliničari u JIL moraju uravnotežiti potrebu za adekvatnom primjenom antibiotika sa rizikom od nepotrebne primjene antibiotika koja potiče razvoj infekcija rezistentnim uzročnicima. Potencijalna strategija uključuje ranu administraciju antibiotika širokog spektra u bolesnika s prisutnim čimbenicima rizika (prethodna hospitalizacija, prethodna primjena više antibiotika, posebno prethodna primjena fluorokinolona i cefalosporina 3. generacije), ali, uz praćenje kliničkog stanja bolesnika, i prekid ili de-eskalaciju antimikrobne terapije po pristizanju mikrobioloških rezultata. Znanje o lokalnoj mikrobnoj flori od velikog je značenja u odabiru primjerene empirijske antimikrobne terapije.

Budući da nema značajnih novosti na području terapije infekcija rezistentnim gram-negativnim uzročnicima te se bilježi se povratak na velika vrata pomalo zaboravljenih antibiotika kao što je kolistin, činjenica je da se racionalnom primjenom antibiotika moramo potruditi što duže sačuvati njihovu učinkovitost.

Ovom studijom potvrđuje se potreba regulacije i racionalne primjene antibiotika, prvenstveno karbapenema, cefalosporina širokog spektra i fluorokinolona.

Ograničavanje primjene antibiotika potrebno je kako bi se usmjerila i po mogućnosti kontrolirala selekcija predominantnih ESBL klonova i diseminacija konjugativnih plazmida. Na taj način bi se smanjio broj potencijalnih ESBL donora i akumulacija gena rezistencije na antibiotike na zajedničkim genetičkim elementima. Ključni elementi su monoterapija (kada je god moguće) u empirijskoj terapiji, optimizacija doze i trajanja antibiotske terapije te redovita procjena politike propisivanja lijekova uz identifikaciju specifičnih problema koji zahtijevaju intervenciju. Nadalje, s obzirom na dokazanu mogućnost brzog širenja pojedinih klonova i plazmida unutar i između različitih bakterijskih vrsta, važno je pridržavanje mjera kontrole infekcije koje trebaju biti definirane posebno i za bolesnike s infekcijom ESBL sojem.

Nameće se zaključak kako je ograničeno vrijeme za potencijalne intervencije u kontroli širenja ESBL mikroorganizama. Ukoliko se prijeđe kritični prag broja ESBL gena u mikrobiološkom svijetu te njihove povezanosti s prenosivim genetičkim elementima uz kritičnu diseminaciju ESBL između različitih bakterijskih vrsta i klonova, kontrolu širenja ESBL sojeva bit će nemoguće ostvariti.

Antibiotici u liječenju ESBL infekcija

U našoj studiji zabilježen je visoki udio neadekvatne antibiotske terapije u liječenju bolesnika s ESBL infekcijom u odnosu na bolesnike s infekcijom običnim sojem EC i KP (73% vs 9%). No, podatak koji zabrinjava je visoki udio neprimjerene antibiotske terapije i nakon dobivanja antibiograma koja je zabilježena u 7 od ukupno 32 bolesnika s izolatom ESBL soja (22%). U 2 od 7 navedenih bolesnika zabilježen je smrtni slučaj povezan s infekcijom, a razlog neadekvatne terapije neposredno pred smrtni ishod bio je kasno pristizanje nalaza antibiograma. U oba bolesnika ESBL izolati izolirani su iz urinokulture. U preostalih 5 bolesnika u kojih je primijenjena neučinkovita antibiotska terapija u liječenju ESBL infekcije, u 3 slučaja zabilježeno je izliječenje infekcije a u 2 slučaja smrtni ishod nepovezan s infekcijom tj. smrt uzrokovana osnovnom bolesti (vidi Tablicu 13). Ovi rezultati govore u prilog potrebi za ranom detekcijom i izvješćivanjem kliničara od strane mikrobiološkog laboratorija kod izolacije ESBL soja.

Karbapenemi

U našoj studiji su karbapenemi bili očekivano najpropisivaniji antibiotici u ciljanoj terapiji ESBL infekcija, propisani u 60% bolesnika s adekvatnom ciljanom antibiotskom terapijom, budući da se smatraju antibioticima izbora za ozbiljne infekcije uzrokovane ovim mikroorganizmima²⁴⁵. Ishodi bolesnika liječenih karbapenemima su u našem istraživanju bili su izliječenje infekcije. Smrtni ishod zabilježen je u 2 bolesnika liječena karbapenemima, no uzrok smrti bila je osnovna bolest.

Danas su dostupni meropenem, imipenem sa cilastatinom, ertapenem i doripenem koji su prisutni i na našem tržištu. U međunarodnoj studiji koja je uključila 12 bolnica u 7 zemalja tijekom dvije godine prospektivno su se skupljali podaci o 455 epizode bakteremije uzrokovane KP, od čega je 85 bilo izazvano sojevima ESBL²⁴⁶.

Liječenje karbapenemom bilo je povezano s manjom 14-dnevnom smrtnošću u usporedbi s drugim antimikrobnim lijekovima sa utvrđenom *in vitro* aktivnošću. Također, u jednom manjem kliničkom ispitivanju liječenje ertapenemom u 20 bolesnika s pneumonijom izazvanom enterobakterijom koja proizvodi ESBL rezultiralo je dobrim kliničkim odgovorom u 80% slučajeva²⁴⁷. I druge studije su povezale manju smrtnost kod primjena karbapenema u liječenju bakterijemija

uzrokovanih ESBL sojevima KP i EC u odnosu na primjenu drugih antibiotika^{176 248}. Rezultati ovih studija te ograničeno kliničko iskustvo u liječenju posebice ozbiljnih infekcija ESBL sojevima drugim antibioticima, dovelo je do poticanja propisivanja karbapenema kod sumnje na mogućnost ovakvih infekcija. No, povećana primjena karbapenema uz praćenje povišene učestalosti izolacije ESBL sojeva među izolatima KP i EC, dovela je do brzog porasta rezistencije na karbapeneme drugih nozokomijalnih patogena, kao što su *P.aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*²⁴⁹. Studija provedena u istom razdoblju ispitivanja (od travnja 2006. - srpanj 2007.godine) u jedinici intenzivne skrbi Klinike za unutrašnje bolesti KBC Zagreb značajno je povezala primjenu meropenema sa učestalošću izolata *P.aeruginosa* rezistentnih na meropenem te multi-rezistentnih izolata *P.aeruginosa*^{250 251}. Zadnjih godina opisuje se povećana rezistencija ESBL KP na karbapeneme uzrokovana produkcijom karbapenemaza. Još je učestalija rezistencija na ertapenem u izolatima *Klebsiella spp.* i *Enterobacter spp.* Veća učestalost rezistentnih enterobakterija na ertapenem je posljedica toga što je rezistencija na ertapenem boljši lakše ostvariva, budući da je za nju potrebna produkcija ESBL uz nepropusnost uzrokovanu promjenama u porinskim kanalima²⁵². Studija Leavitta i suradnika zabilježila je da je većina ertapenem rezistentnih ESBL KP bila osjetljiva na meropenem (80%) i imipenem/cilastatin (96%)²⁵². Zabilježena je mogućnost razvoja rezistencije i na imipenem koja nije uzrokovana produkcijom karbapenemaza²⁵³. Najviše kliničkih podataka o liječenju ESBL infekcija dostupno je za meropenem, imipenem/cilastatin i ertapenem. Doripenem je najnoviji karbapenem širokog spektra koji uključuje aktivnost protiv gram-pozitivnih, anaeroba i gram-negativnih bakterija uključujući *P.aeruginosa*, *A.baumannii* te ESBL sojeve *K.pneumoniae* i *E.coli*²⁵⁴. Svi karbapenemi dostupni su u Hrvatskoj.

Cefalosporini

U našem istraživanju su ESBL izolati bili rezistentni ili intermedijarno osjetljivi na ove antibiotike, osim jednog izolata ESBL EC *in vitro* osjetljivog na ceftriakson, cefepim i ceftazidim (vidi Tablicu 16). U jednog bolesnika zabilježen je nastavak terapije ceftriaksonom (uz metronidazol) i nakon pristizanja izolata ESBL soja i antibiograma (uz rezistenciju na ceftriakson) te smrtni ishod povezan s infekcijom (vidi Tablicu 13).

Cefalosporini 2. i 3. generacije se ne smatraju optimalnim izborom liječenja infekcija izazvanih bakterijama koje proizvode ESBL, jer se smatra da postoji rezistencija ovih bakterija na navedne antibiotike²⁵⁵. U jednoj retrospektivnoj studiji bolesnici liječeni imipenemom/cilastatinom zbog bolničke bakteremije izazvane *E. coli* ESBL ili *K. pneumoniae* ESBL imali su veće izgleda za preživljenje od onih liječenih cefalosporinom 3. generacije²⁵⁶. Prethodno liječenje cefalosporinom se pokazalo kao neovisan čimbenik rizika za razvoj infekcije sojem ESBL te se stoga preporuča racionalna i oprezna uporaba cefalosporina 3. generacije²⁵⁵. Takav zaključak potvrdio je i ekološki dio našeg istraživanja.

Istraživanja su razmatrala mogućnost liječenja infekcija ESBL sojevima koji stvaraju CTX-M tip ESBL ceftazidimom kada postoji *in vitro* osjetljivost. Bin i suradnici su proveli prospektivnu opservacijsku studiju koja je uključila 22 bolesnika s bakteremijom izazvanom *E. coli* koja proizvodi CTX-M; 7 bolesnika je liječeno ceftazidimom, 8 imipenemom sa cilastatinom; 7 cefoperazonom sa sulbaktamom²⁵⁶. Bolesnici su bili usporedivih demografskih karakteristika, a uspjeh liječenja bio je sličan u sve tri skupine. Ova studija naviješta da bi se infekcija *E. coli* koja proizvodi enzim CTX-M, a osjetljiva je na ceftazidim, mogla uspješno liječiti ovim lijekom. Međutim, potrebne su randomizirane kontrolirane kliničke studije.

Cefepim kao 4. generacija cefalosporina pokazuje poboljšanu aktivnost prema ESBL enterobakterijama u usporedbi s ostalim cefalosporinima. *In vitro* su bakterije uglavnom osjetljive na cefepim²⁵⁷. Zanetti i suradnici izvijestili su o rezultatima randomizirane kontrolirane multicentrične studije koja je usporedila cefepim s imipenemom/cilastatinom u liječenju bolničkih penumonija u JIL²⁵⁸. Iako nije dizajnirana kao studija koja bi pratila učinke liječenja ESBL infekcije, analizom podskupina se utvrdilo da je među 23 bolesnika s infekcijom izazvanom sojem ESBL odgovor na terapiju izostao kod 4 od 13 liječenih cefepimom, te 0 od 10 liječenih imipenemom/cilastatinom. U svim slučajevima izolati su *in vitro* bili osjetljivi na cefepim. U studiji Kanga i suradnika primjena cefalosporina u terapiji bakterijemije uzrokovane ESBL sojevima KP ili EC bila je povezana s povećanim mortalitetom, i u slučajevima kada su ESBL sojevi bili osjetljivi na cefalosporine u terapiji²⁴⁸.

Kombinacija beta-laktamskog antibiotika i inhibitora beta-laktamaze

U našem istraživanju zabilježen je samo jedan bolesnik u kojeg je po izolaciji ESBL soja iz urinokulture i pristizanju antibiograma nastavljeno liječenje kombinacijom

amoksicilina i klavulanske kiseline. U ovog bolesnika zabilježen je smrtni ishod zbog osnovne bolesti i nepovezan s infekcijom. No, znaci infekcije su bili prisutni u vrijeme smrti u ovog bolesnika. U ESBL izolata uključenih u naše istraživanje zabilježen je visoki udio rezistencije na kombinaciju beta-laktamskih antibiotika i inhibitora beta-laktamaza, posebno u KP (vidi Tablicu 16).

Klinički dokazi o mjestu i korisnosti ovih lijekova u liječenju ESBL infekcija su ograničeni. Stupanj inhibitornog učinka na hidrolizu beta-laktama ESBL enzimima može varirati u ovisnosti o tipu inhibitora kao i o tipu ESBL. Tako je utvrđeno da je tazobaktam potentniji u odnosu na klavulansku kiselinu protiv odedenih CTX-M tipova ESBL⁵⁰, dok su oba potentnija u odnosu na sulbaktam u inhibiciji TEM i SHV tip ESBL²⁵⁹.

Postoje naznake da se može očekivati povoljan ishod liječenja u slučaju *in vitro* osjetljivosti na piperacilin/tazobaktam. Studija koju su proveli Rodrigues-Bano i suradnici procjenjivala je upotrebu amoksicilina/klavulanske kiseline u 37 bolesnika sa cistitisom uzrokovanim *E. coli* ESBL²⁶⁰. Stopa izlječenja bila je 84%; ipak, učinkovitost je bila niža u podskupini koja je imala infekciju izolatima s višim MIK-ovima za amoksicilin/klavulansku kiselinu. Opisan je slučaj uspješnog liječenja infekcije mokraćnog sustava amoksicilinom/klavulanskom kiselinom u slučaju *in vitro* rezistencije bakterije na amoksicilin/klavulansku kiselinu²⁶¹.

To dovodi do zaključka da bi se amoksicilin/klavulanska kiselina umjesto cefalosporina mogla koristiti u liječenju infekcija osjetljivim ESBL izolatima, no problem je s ovim pristupom to što visoko prilagodljiva molekula TEM-1 može podleći nizu mutacija koje mogu dovesti do rezistencije na inhibitore beta-laktamaze te rezultirati stvaranjem na inhibitor rezistentne TEM (IRT)²⁶².

Dostupni podaci ukazuju na mogućnost upotrebe piperacilina/tazobaktama u liječenju nekih infekcija sojevima ESBL. No, na temelju evaluacije farmakodinamike i farmakokinetike može se zaključiti da je mogućnost dostizanja farmakodinamskog cilja liječenja osjetljivih sojeva ESBL KP i EC manja za piperacilin/tazobaktam u odnosu na cefepim u primjeni konvencionalnih sheme doziranja²⁶³. Nadalje, sve veća rezistencija ESBL sojeva na ovu kombinaciju ograničava potencijalnu terapijsku primjenu ovog lijeka. Jedna studija ukazala je na mogući protektivni učinak primjene ampicilina/sulbaktama na izolaciju ESBL KP sojeva. Autori su pretpostavili da moguće, iako kombinacija ampicilina/sulbaktama ima zanemaruju ulogu u liječenju ESBL infekcija, da inhibitorni učinak sulbaktama predstavlja zaštitu

od kolonizacije ESBL sojevima koja često prethodni infekciji²⁶⁴. Na isti način objašnjava se protektivna uloga piperacilin/tazobaktama uočena u nekim studijama, no, prije definitivnih preporuka ipak se očekuju rezultati velikih randomiziranih studija²⁴⁵.

Aminoglikozidi

Nakon karbapenema, aminoglikozidi su bili najučestalije propisivani antibiotici u ciljanoj antimikrobnoj terapiji ESBL infekcije u ovom istraživanju. U bolesnika u kojih je po pristizanju antibiograma propisan aminoglikozid u svim slučajevima izolirani je ESBL soj bio osjetljiv ili intermedijarno osjetljiv na aminoglikozide (u 2 bolesnika). U većini bolesnika u kojih je liječenje po pristizanju antibiograma nastavljeno aminoglikozidima radilo se o infekciji urinarnog trakta. U većini slučajeva amikacin je bio propisan u kombinaciji sa beta-laktamskim antibiotikom uz povoljan ishod (izlječenje infekcije), a u jednog bolesnika propisan je u terapiji infekcije mokraćnog sustava u monoterapiji. U jednog bolesnika zabilježen je smrtni ishod nepovezan s infekcijom (vidi Tablicu 13).

Enzimi ESBL su često smješteni na velikim plazmidima koji nose gene za rezistenciju na druge antimikrobne lijekove, osobito gentamicin i tobramicin. Među bakterijama koje proizvode ESBL najviša je osjetljivost na amikacin²⁶⁵. No, aminoglikozidi imaju ograničen uspjeh u liječenju bakteremija izazvanih ESBL *K. pneumoniae*. Prema podacima Kima i suradnika koja je uključila pedijatrijske bolesnike, od 36 bolesnika sa bakterijemijom uzrokovanom ESBL sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae*, samo je 7 od 15 liječenih aminoglikozidom pokazalo dobar klinički odgovor²⁶⁶. I u studiji Kanga i suradnika mortalitet bolesnika liječenih aminoglikozidima u ciljanoj terapiji bio je viši u odnosu na bolesnike liječene fluorokinolonima ili karbapenemima²⁴⁸. Aminoglikozidi su u primjeni više desetljeća. No, u monoterapiji je njihova učinkovitost potvrđena samo u infekcijama urinarnog trakta, a meta-analize nisu pokazale prednosti kombinacije aminoglikozida sa beta-laktamskim antibioticima u odnosu na monoterapiju beta-laktamima. Prema dostupnim podacima, takva kombinacija bi mogla imati prednosti u teškoj sepsi²⁶⁷. S obzirom na navedeno te na rezultate našeg istraživanja, aminoglikozidi bi mogli imati ulogu u liječenju urinarnih infekcija s osjetljivim ESBL sojevima.

Fluorokinoloni

U ovom istraživanju je monoterapija ESBL infekcije fluorokinolonima nakon pristizanja antibiograma zabilježena u 4 bolesnika (2 bolesnika su liječena ciprofloksacinom a 2 bolesnika norfloksacinom), a u tri bolesnika je takva terapija bila neadekvatna s obzirom na rezistenciju izolata na fluorokinolone. U dva od navedena 3 bolesnika s neadekvatnom terapijom ESBL infekcije zabilježen je smrtni ishod. U jednog bolesnika liječenog norfloksacinom zbog infekcije urinarnog trakta smrtni ishod bio je povezan s infekcijom. U jednog bolesnika liječenog ciprofloksacinom zbog infekcije mokraćnog sustava ESBL sojem KP osjetljivim na ciprofloksacin zabilježeno je izliječenje infekcije.

Rezistencija enterobakterija koje proizvode ESBL na fluorokinolone je 55% do 100% u raznim krajevima svijeta²⁶⁸. U našem istraživanju rezistencija ESBL izolata na fluorokinolone bila je 54%. Shodno tome, kinoloni imaju vrlo ograničenu ulogu u liječenju infekcija izazvanih sojevima ESBL. Ipak, oni ostaju moguća opcija, ako je izolat osjetljiv na njih^{269 245}. Posebno visoka rezistencija na fluorokinolone zabilježena je u sojevima sa CTX-M tipom ESBL. Rezistencija ESBL sojeva na fluorokinolone može biti uzrokovana mutacijama specifičnih gena ili može biti uzrokovana prenošenjem gena rezistencije plazmidima. S obzirom da se fluorokinoloni često koriste u liječenju infekcija urinarnog trakta, a urinarni trakt je najvažniji izvor CTX-M-15 producirajućih izolata, moguće je da fluorokinoloni ostvaruju selekcijski pritisak koji ide u prilog preživljenju izolata rezistentnih na kinolone²⁷⁰.

U studiji Kanga i suradnika mortalitet bolesnika liječenih zbog bakterijemije uzrokovane ESBL sojem KP ili EC, bio je značajno niži u grupi bolesnika liječenih ciprofloksacinom i karbapenemima (10% i 13%), u odnosu na grupu bolesnika liječenih cefalosporinom ili aminoglikozidom (27%)²⁴⁸. Studija Patersona i suradnika zaključila je da u terapiji bakterijemije uzrokovane ESBL KP karbapenemi imaju prednost u odnosu na fluorokinolone¹³⁸.

Drugi antibiotici

Većina kliničara izbjegava upotrebu **cefamicina** u liječenju infekcija izazvanih sojevima ESBL zbog *in vivo* selekcije rezistentnih sojeva, osobito kod upotrebe starijih lijekova kao cefoksitin²⁷¹. Lee i suradnici su procjenjivali novi cefamicin, flomoksetil, u retrospektivnoj studiji i usporedili kliničku učinkovitost ovoga lijeka s

učinkovitošću karbapenema, meropenema i imipenema/cilastatina, u liječenju ESBL pneumonije²⁷². Uključili su 27 bolesnika, a klinička učinkovitost flomoksefa je bila slična kao karbapenema. Nažalost, studija je imala svojih nedostataka, ali upućuje na potencijanu mogućnost upotrebe cefamicina u ovoj indikaciji. Studija Lee i suradnika upozorila je na mogućnost razvoja rezistencije na ertapenem kao „kolateralne štete“ primjene flomoksefa u liječenju bakterijemije uzrokovane ESBL sojem KP²⁷³. Cefamicini nisu dostupni na hrvatskom tržištu.

Fosfomicin je baktericidni antibiotik koji djeluje kao inhibitor staničnog zida interferirajući s prvim korakom u sintezi peptidoglikana. Ima širok spektar aktivnosti, a rezistencija kliničkih izolata je rijetka²⁷⁴. Vrlo je rijetka rezistencija *E. coli* (oko 2%). U Španjolskoj je nedavno provedena studija u kojoj je od 428 izolata ESBL 97,4% pokazalo osjetljivost na fosfomicin; rezistencija *E. coli* ESBL bila je 0,3%, a *K. pneumoniae* 7,2%²⁷⁵. U nekim zemljama je upotreba fosfomicina značajno porasla i postao je lijek izbora u liječenju nekompliciranog cistitisa²⁷⁶. Nažalost, nedavno je u Španjolskoj izvijesteno o rezistenciji klona *E. coli* ST 131 na fosfomicin²⁷⁷. U Hrvatskoj fosfomicin nije registriran.

Nitrofurantoin još uvijek ima ulogu i propisuje se u liječenju nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava²⁷⁴. Stopa rezistencije na nitrofurantoin u 115 kliničkih izolata *E. coli* ESBL u Španjolskoj je 29%²⁷⁸, dok je u Kanadi samo 7%²⁷⁹. Nitrofurantoin je ograničen na liječenje ili prevenciju nekompliciranog cistitisa, a jedna je od opcija u liječenju nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava bakterijama koje proizvode ESBL. Međutim, budući da je odgovor na ovaj lijek obično manje zadovoljavajući i zahtijeva dugotrajniju terapiju, on ipak ostaje više alternativa nego lijek prvog izbora²⁷⁴.

Tigeciklin, derivat minociklina, pokazao je izvrsnu aktivnost protiv *E. coli* ESBL, pogotovo one koja proizvodi enzime CTX-M²⁸⁰. Klinički podaci o učinkovitosti tigeciklina na infekciju uzrokovanu ESBL bakterijom su trenutno rijetki. Međutim, farmakokinetički i farmakodinamički parametri tigeciklina donose sumnju u moguću korisnost ovog lijeka u liječenju specifičnih infektivnih sindroma, kao što su infekcije mokraćnog sustava i bakterijemija¹⁶¹. S obzirom da se samo 10-15% doze tigeciklina izlučuje kao aktivan lijek u urinu, ta koncentracija lijeka u mokraći nije dovoljna za liječenje infekcija mokraćnog sustava. S obzirom na značajnu distribuciju lijeka u tkiva, smatra se da dostupne koncentracije lijeka u serumu vjerojatno ne bi bile dovoljne za liječenje bakterijemija uzrokovanih ESBL sojevima.

Ostali antibiotici kao što su temociklin, pivmecilinam i kolistin pokazuju dobru *in vitro* aktivnost prema ESBL bakterijama²⁸¹, no u ovom trenutku nema dostupnih kliničkih podataka o upotrebi ovih lijekova u liječenju ovih infekcija. Temociklin, derivat tikarcilina, je rezistentan na hidrolizu većine ESBL i AmpC beta- laktamaza. Opisan je slučaj relapsa pijelonefritisa izazvanog *E. coli* CTX-M, koji je izliječen produljenom terapijom oralnim pivmecilinamom²⁸².

Ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje sastojalo se od ekološke (skupni podaci), *case-control* (individualni podaci) i studije molekularne epidemiologije. Svaka od ovih studija ima svoja ograničenja.

Ekološki dizajnirane studije uspoređuju ukupnu razinu potrošnje antibiotika s rezistencijom izolata i temelje se na agregiranim podacima,

Međutim, primjena samo ekološkog dizajna studije ne daje potpune podatke jer se iz njih ne može doznati je li bolesnik s izolatom ESBL doista i primio određeni antibiotik, druge antibiotike ili ima li čimbenike rizika povezane s rizikom od rezistencije. Iako se problem rezistencije bakterija na antibiotike smatra primarno ekološkim, primjena samo takvih podataka može podcijeniti utjecaj neadekvatne primjene antibiotika. Veza između primjene antibiotika i bakterijske rezistencije je složena te potpuno razumijevanje i proučavanje ovih mehanizama nije moguće bez istodobnog analize i ekoloških (skupnih) podataka i individualnih podataka o bolesnicima.

Zbog opisanog ograničenja, istraživanje utjecaja primjene antibiotika na prevalenciju infekcije ESBL KP i EC provodeno je i na individualnoj razini. Kao ograničenje ovog istraživanja na individualnoj razini može se navesti i sam odabir *case-control* dizajna. Naime, odabir kriterija koji omogućavaju komparabilnost skupina (u ovom slučaju dob, JIL i težina kliničkog stanja: APACHE II) može onemogućiti potvrđivanje tih istih kriterija kao čimbenika rizika. Naime, povećanjem broja kriterija, smanjuje se broj čimbenika rizika koji se mogu otkriti budući da bolesnici postaju sve sličniji. No, s druge strane, odabir dobi, JIL-a i APACHE II kao kriterija za selekciju kontrola ipak smanjuje pristranost u selekciji bolesnika i time povećava kvalitetu studije. Nadalje, u *case-control* studijama prethodna primjena antibiotika može biti precijenjena ukoliko su kontrole odabrane u skupini bolesnika sa osjetljivim uzročnikom. Posljednjih godina sve više se primjenjuje *case* (bolesnici sa rezistentnim uzročnikom)-*case*

(bolesnici sa osjetljivim uzročnikom)-*control* (bolesnici sa drugim uzročnicima) dizajn, u kojem odabir kontrolne skupine među bolesnicima koji se liječe od infekcije uzrokovane drugim uzročnicima od proučavanog onemogućava precijenjenost prethodne antimikrobne terapije kao čimbenika rizika. U *case-control* studiji koja je dio ovog istraživanja kao čimbenik rizika izolirana je ukupna primjena antibiotika te specifično primjena flurokinolona i makrolida te precijenjenost primjene antibiotika ne predstavlja poseban problem. Kako primjena makrolida nije u ekološkoj studiji povezana s učestalošću izolata ESBL, ne može se isključiti precijenjenost primjene makrolida kao čimbenika rizika uslijed samog odabira *case-control* dizajna studije na individualnoj razini

Daljnje ograničenje ovog istraživanja je da ono nije provedena u svim jedinicama intenzivne skrbi, posebno s obzirom na ukupnu učestalost izolacije ESBL KP i EC koja je u promatranom razdoblju bila 25% u neuključenim JIL (urološka, kirurška, kardiokirurška) . Nadalje, može se pretpostaviti da različiti tipovi bolesnika koji se liječe u različitim JIL imaju druge čimbenike rizika za infekciju ESBL sojem.

Rezultati ovog istraživanja ne mogu se primijeniti na druge sredine, posebice na sredine ili ustanove s niskom prevalencijom izolacije ESBL sojeva te na ustanove koje imaju drugačije protokole za propisivanje empirijske antibiotske terapije (rotacija antibiotika, automatizirani sistemi za konzultacije, i sl.)²⁸³.

Daljnje ograničenje istraživanja jest izostanak praćenja provođenja mjera kontrole infekcije. No, odsutnost slike značajnog klonalnog širenja ESBL sojeva u promatranom razdoblju u studiji molekularne biologije indirektno ukazuje na manjak većih odstupanja u provođenju mjera kontrole infekcije.

Prednosti istraživanja

Najveća je prednost ovog istraživanja sveobuhvatnost analize problema potrošnje antibiotika i izolacije ESBL sojeva KP i EC.

Unatoč prethodno navedenim ograničenjima ekoloških studija, ne može se osporiti njihova koristnost u ocjeni utjecaja primjene antibiotika, budući da dopuštaju mjerenje ukupnog učinka ekspozicije antibioticima. Važno je razumjeti da ekološka šteta uzrokovana širokim propisivanjem antibiotika izlazi iz okvira bolesnika koji dobiva antibiotik. To znači da štetnost ukupnog propisivanja antibiotika, utječući poticajno na selekciju i diseminaciju rezistentnih sojeva, ima tako utjecaj i na bolesnike koji ne primaju antibiotike (tzv. kolateralna šteta). Potencijal za prijenos

patogena znači da kolateralna šteta može zahvatiti druge bolesnike, posebno u bolničkoj sredini, tako da se lako prenosivi bakterijski sojevi i neoptimalna kontrola infekcije, uz nedovoljno kapaciteta za adekvatnu izolaciju bolesnika, udruženo povećavaju ekološku štetu povezanu sa propisivanjem antibiotika.

Nadalje, unatoč navedenim ograničenjima, *case-control* studija ima i prednosti. Iako je prema dizajnu *case-control* studij retrospektivna, prednosti naše studije su da su podaci prikupljeni većim dijelom prospektivno što povećava njihovu kvalitetu.

Nadalje, budući da naše istraživanje uz *case-control* studiju uključuje i ekološku studiju, utjecaj antimikrobne terapije na prevalenciju infekcije ESBL sojem KP i EC provjerena je na dvije razine.

Vrijednost otkrivene povezanosti primjene antibiotika na rizik infekcije ESBL sojem u JIL, dodatno je potvrđena PFGE genotipizacijom koja je zbog dobivanja sveobuhvatnih podataka o epidemiologiji infekcija KP i EC, uključila ne samo ESBL, nego i osjetljive sojeve KP i EC. PFGE genotipizacija nije pokazala epidemijsku sliku vezanu uz ESBL infekcije u uključenim JIL, što ukazuje da znatan udio u problemu povećanja učestalosti ESBL izolata ima nekritična primjena antibiotika.

Predložene mjere u kontroli ESBL infekcija

Na temelju rezultata ove studije mogu se predložiti slijedeće mjere:

1. Veća restrikcijom primjene fluorokinolona na razini bolnice te u JIL.
2. Pojačan nadzor u potrošnji karbapenema, cefalosporina širokog spektra i aminoglikozida u JIL.
3. Informiranje liječnika u JIL o rizičnim faktorima za ESBL infekciju u lokalnoj sredini (produženi boravak u JIL, prethodna primjena antibiotika, prethodna primjena fluorkinolona).
4. U liječenju teških ESBL infekcija (pneumonija, meningitis, intraabdominalne infekcije, sepsa) karbapenemi su antibiotici izbora.
5. Neadekvatna kontrola simptoma infekcije kod dugotrajno hospitaliziranih bolesnika u JIL opravdava primjenu karbapenema.
6. Budući da se mnoge infekcije ESBL sojem javljaju u bolesnika sa rekurentnim urinarnim infekcijama, racionalna primjena antibiotika posebice se treba poticati u ovoj indikaciji. Budući da su u liječenju urinarnih infekcija sa osjetljivim sojevima ESBL često učinkoviti fluorokinoloni, aminoglikozidi, cefepim te beta-laktami sa inhibitorima

beta-laktamaze, promjena smjernica u liječenju urinarnih infekcija mogla bi biti važan pristup u kontroli selekcijskog pritiska primjene antibiotika . Nitrofurantoin može biti učinkovit kod liječenja nekompliciranih infekcija donjeg urinarnog trakta, no ostaje više alternativa nego izbor.

7. Uvođenje mjera rane detekcije i rano alarmiranje kliničara od strane mikrobiološkog laboratorija kod izolacije ESBL soja uz obraćanje posebne pažnje u kontaktu s bolesnikom koloniziranim ili sa infekcijom ESBL sojem, ako je moguća izolacija.
8. Stalna kontrola učestalosti izolacije ESBL sojeva u JIL uz genotipizaciju kod klastera.
9. Povratni podaci iz mikrobiološkog laboratorija u JIL kliničarima (svaka 2 ili 3 mjeseca) o učestalosti izolacije ESBL sojeva EC i KP.
10. Zajedničko osmišljavanje strategije primjene antibiotika u JIL (mikrobiolog, intenzivist, infektolog, klinički farmakolog).
11. Redovito izdavanje smjernica za primjenu antimikrobnih lijekova sa posebnim naglaskom na JIL.

ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije potvrdili su hipotezu da je potrošnja antibiotika u JIL najvažniji čimbenik rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC.

Najznačajniji čimbenici rizika za ESBL infekciju bili su prethodna primjena antibiotika općenito, dužina primjene i broj prethodno primijenjenih antibiotika te dužina boravka u JIL.

Pojedinačni antibiotici koji su utvrđeni kao značajni čimbenici rizika su fluorokinoloni i makrolidi. Dok je primjena fluorokinolona očekivani čimbenik rizika za ESBL infekcije, primjena makrolida do sada nije opisana kao čimbenik rizika za ESBL infekciju. Iako su do sada cefalosporini 3.generacije naglašavani kao važan rizični čimbenik rizika za ESBL infekciju, oni u *case-control* studiji nisu potvrđeni kao čimbenik rizika dok su zajedno s fluorokinolonima potvrđeni kao čimbenici rizika za ESBL infekciju u ekološkoj studiji što upućuje na mogućnost neželjenog učinka ukupne primjene cefalosporina 3.generacije u istraživanim JIL na učestalost izolacije ESBL sojeva, iako je na individualnoj razini relativno mali broj bolesnika s ESBL infekcijom bio prethodno izložen njihovoj primjeni.

Genotipizacija KP i EC sojeva u promatranom razdoblju u istraživanim JIL potvrdila je relevantnost gore navedenih zaključaka, pokazujući miješanu epidemiološku situaciju, tj. prisutnost manjih klonalnih grupa istovremeno s pojedinačnim klonovima uzročnika, no bez utrdivanja epidemijske situacije. S obzirom na rezultate genotipizacije može se zaključiti da je problem infekcije ESBL sojevima kombinacija problema sa horizontalnim prijenosom u manjoj mjeri te u većoj mjeri primjene antibiotika.

Rezultati ove studije ukazuju na potrebu racionalne i kontrolirane potrošnje antibiotika, posebno fluorokinolona i cefalosporina 3.generacije, dok se uloga makrolida u selekciji ESBL sojeva treba odrediti daljnjim studijama.

SAŽETAK

Bilježi se značajno povećanje učestalosti infekcija sojevima *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* koje produciraju beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL), posebno u jedinicama intenzivne skrbi (JIL). Cilj ove studije bio je utvrditi lokalne čimbenike rizika za infekciju ESBL sojem, s naglaskom na definiranje uloge antibiotika .

Studija je provedena u 3 JIL na 3 razine: 2) studija slučajeva s kontrolama; 1) ekološka studija, i 3) genotipizacija reprezentativnog uzorka izolata.

Ekološka studija utvrdila je povezanost učestalosti izolacije ESBL sojeva s primjenom fluorokinolona i cefalosporina 3.generacije s vremenskim odmakom od 2 mjeseca. Potrošnja karbapenema, cefalosporina, aminoglikozida, glikopeptida i klindamicina također je bila značano povezana s prevalencijom ESBL izolata, bez vremenskog odmaka.

Čimbenici rizika utvrđeni u studiji slučajeva s kontrolama bili su: dužina hospitalizacije u JIL, prethodna antibiotska terapija, broj propisanih antibiotika te prethodna primjena makrolida i fluorokinolona. Mortalitet i učestalost primjene neadekvatne antibiotske terapije bili su veći u grupi bolesnika s ESBL infekcijom. Genotipizacija izolata utvrdila je da su i selekcijski pritisak primjene antibiotika i horizontalni prijenos važni čimbenici rizika za infekciju ESBL sojem KP i EC.

Rezultati ove studije potvrđuju da je primjena antibiotika najvažniji čimbenik rizika za ESBL infekciju, naglašavaju važnost i potrebu za racionalnom primjenom antibiotika, posebno fluorokinolona, uz strogo pridržavanje mjera kontrole infekcije.

SUMMARY

The impact of antimicrobial consumption on the selection of extended-spectrum beta-lactamases producing (ESBL, AmpC) strains and on patients outcomes

There is an increase in infections caused by extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, especially in intensive care units (ICUs). The aim of this study was to identify local risk factors for ESBL infection, with emphasis on defining the position of antibiotics.

This study was conducted in 3 ICUs at 3 levels: 2) *case-control* study; 1) ecological study, and 3) isolate genotipization.

Ecological study demonstrated that the use of fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporins was significantly associated with the increase in frequency of ESBL strains isolation with a delay of 2 months. The use of carbapenems, piperacillin/tazobactam, cephalosporins, aminoglycosides, glycopeptides and clindamycin was also significantly associated with the frequency of ESBL KP/EC isolates, without delay. Risk factors for ESBL infection identified in the *case-control* study were: duration of ICU stay, previous antimicrobial therapy, number of prescribed antibiotics, previous use of macrolides and fluoroquinolones. Mortality and inadequate antimicrobial therapy were more frequent in the ESBL group. Isolate genotipization revealed that both selection pressure and horizontal transfer are important factors for ESBL infection.

This study confirms that antibiotic consumption is the main risk factor for ESBL infection. Rational use of antibiotics, especially fluoroquinolones, is needed in the control of ESBL infections in ICUs, as well as strict adherence to infection control measures.

LITERATURA:

-
- ¹ Weinstein RA. Nosocomial infection update. *Emerg Infect Dis* 1998;4:416-420.
 - ² Behar P, Wagner MB, Freitas I, Auler A, Selistre L, Fossati L, i sur. Assessing the antimicrobial prescription request process in a teaching hospital in Brazil: regulations and training. *Braz J Infect Dis*.2000;4:76-85.
 - ³ Lawton RM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE. Practices to improve antimicrobial use at 47 US hospitals:the status of the 1997 SHEA/IDSA position paper recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol*.2000;21:256-9.
 - ⁴ The Centers for Disease Control and Prevention. Four paediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- Minnesota and North Dakota 1997-1999. *JAMA* 1999;282:1123-1125.
 - ⁵ Groom AV, Woolsey DH, Naimi TS, i sur. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* 2001;286:1201-1205.
 - ⁶ Garau J. Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia. *Lancet Infect Dis* 2002;2:404-415.
 - ⁷ Chang S, Sievert DM, Hageman, i sur. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med* 2003;348:1342-1347.
 - ⁸ Powers JH. Antimicrobial drug development-the past, present and future. *Clin Microbiol Infect*.2004;10(Suppl 4):23-31.
 - ⁹ Gleason TG, Crabtree TD, Pelletier SJ, i sur. Prediction of poorer prognosis by infection with antibiotic-resistant gram positive cocci than by infection with antibiotic-sensitive strains. *Arch Surg* 1999;134:1033-1040.
 - ¹⁰ Ibelings MM, Bruining HA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Acquisition and risk of death in patients in the intensive care unit. *Eur J Surg* 1998;164:411-418.
 - ¹¹ Kollef MH, Silver P, Murphy DM, i sur. The effect of late-onset ventilator-associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest* 1995;108:1655-1662.
 - ¹² Crouch Brewer S, Wunderink RG, Jones CB, i sur. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 1996;109:1019-1029.

-
- ¹³ Lopez Lozano JM, Monnet DL, Yague A, i sur. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int J Antimicrob Agents*.2000;14:21-31.
- ¹⁴ Davey P, Brown E, Fenelon L, Finch R, Gould I, Holmes A, i sur. Systematic Review of Antimicrobial Drug Prescribing in Hospitals.2006;(12):211-16.
- ¹⁵ Bronzwaer SLA, Bucholz. International surveillance of antimicrobial resistance in Europe: now we also need to monitor antibiotic use.*Eurosurveillance*.2001;6(1):1-16.
- ¹⁶ Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, i sur. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:531-539.
- ¹⁷ Fridkin SK, Pear SM, Williamson TH, i sur. The role of understaffing in central venous catheter-associated bloodstream infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:150-158.
- ¹⁸ Harbarth S, Sudre P, Dharan S, i sur. Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:598-603.
- ¹⁹ Bonten i sur. The Role of “Colonization pressure” in the Spread of Vancomycin Resistant Enterococci. *Arch Int Med* 1998;158:1127-32.
- ²⁰ Goldman DA, Weinstein RA, Wenzel RP, i sur. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. *J Am Med Assoc* 1996;275:234-40.
- ²¹ Snyder LL, Clyne KE, Wagner JC. Antibiotic sensitivity and the prescribing information sheet: assisting the prescribing physician. *Am J Infect Control* 1990;18:399-404.
- ²² Kollef MH, Sherman G, Ward S, i sur. Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999;115:462-474.
- ²³ Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, i sur. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118;146-155.
- ²⁴ Gerding DN, Larson TA, Hughes RA, i sur. Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: Ten years of experience in one hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1284-1290.

-
- ²⁵ Kollef MH, Sherpless I, Vlasnik J, i sur. the impact of nosocomial infections on patient outcomes following cardiac surgery. *Chest* 1997;112:666-675.
- ²⁶ Quale J, Landman D, Saurina G, i sur. Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 1996;23:1020-1025.
- ²⁷ Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, i sur: The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *N Engl J Med* 1997;337:441-446.
- ²⁸ Kalenic S, Francetic I, Polak J, i sur. Impact of ampicillin and cefuroxime on bacterial colonization and infection in patients on an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 1993;23:35-41.
- ²⁹ Bryce EA, Smith JA. Focused microbiological surveillance and gram-negative beta-lactamase-mediated resistance in an intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:331-334.
- ³⁰ Jarvis WR, Edwards JR, Culver DH, i sur. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. *Am J Med* 1991;91 (suppl 3B):185-191.
- ³¹ Gaynes R. Antibiotic resistance in ICUs: a multifaceted problem requiring a multifaceted solution. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995;16:328-330.
- ³² Monnet, DL, Lennox KA, Phillips L, i sur. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. *Inf Control Hosp Epidemiol.* 1998:388-394.
- ³³ Flornoy DJ, Reinert RL, Bell-Dixon C, Gentry A. Increasing antimicrobial resistance in gram-negative bacilli isolated from patients in intensive care units. *Am J Infect Control* 2000;28:244-250.
- ³⁴ Quintiliani R, JR, Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents. Murray PR i sur. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington DC 1999:1505-1525.
- ³⁵ Jacoby G, Munoz-price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-391.

-
- ³⁶ Ambler, R.P., A.F. Coulson, J.M. Frere, J.M. Ghuysen, B.Joris, M.Forsman, R.C. Levesque, G.Tiraby, S.G.Waley. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991;276:269-270.
- ³⁷ Bush, K., G.A.Jacoby, A.A.Medeiros. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents chemother* 1995;39:1211-1233.
- ³⁸ Zanetti, G., F.Bally, G.Greub, J.Garbino, T.Kinge, D.Lew, J.A.Romand, J.Bille, D.Aymon, L.Stratchounski, L.Krawczyk, E.Rubinstein, M.D.Schaller, R.Chiolero, M.P.Glauser, A.Cometta. Cefepima versus imipienem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3442-3447.
- ³⁹ Medeiros, A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generation of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect dis* 1997;24(Suppl 1):19-45.
- ⁴⁰ Petit A, Yaghlane-Bousslama H B, Sofer L, Labia R. Characterization of chromosomally encoded penicillinases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:629-638.
- ⁴¹ Phillipon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 1989;33:1131-1136.
- ⁴² Casellas J M, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum β -lactamases. *Infection* 1989;17(6):88-90.
- ⁴³ Petit A, Sirot D L, Chanal C M, Sirot J L, Labia R, Gerbaud G, Cluzel R A. Novel plasmid mediated β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother* 1988;32(5):626-630.
- ⁴⁴ Paterson, D.L., K.M. Hujer, A.M.Hujer, H. Yeiser, M.D. Bonomo, L.B. Rice, R.A. Bonomo. Extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3554-3560.
- ⁴⁵ Datta, N., P.Kontomichalou. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 1965;208:239-241.
- ⁴⁶ Sougakoff W, Goussard S, Courvalin P. The TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Let* 1988;56:343-348.

-
- ⁴⁷ Perilli, M. A.Felici, N.Franceschini, A.De Santis, L.Pagani, F.Luzzaro, A.Oratore, G.M. Rossolini, J.R.Knox, G.Micosante. Characterization of a new TEM-derived beta-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2374-2382.
- ⁴⁸ Tzouveleakis, L.S., E.Tzelepi, P.T.Tassions, N.J. Legakis. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:137-142.
- ⁴⁹ Yu, W.L., M.A. Pfaller, P.L. Winokur, R.N. Jones. Cefepime MIC as a predictor of the extended-spectrum beta-lactamase type in *Klebsiella pneumoniae*. *emerg Infect Dis* 2002;8:522-524.
- ⁵⁰ Bush, K., C.Macalintal, B.A.Rasmussen, V.J. Lee, Y.Yang. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:851-858.
- ⁵¹ Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
- ⁵² Gniadkowski, M., I.Scheider, A.Palucha, R.Jungwirth, B.Mikiewicz, A.Bauernfeind. Cefotaxime-resistant enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents chemother* 1998;42:827-832.
- ⁵³ Karim A, Poirel L, Nagarajan S, i sur. Plasmid-mediated extended spectrum beta lactamase (CTX-M -3 like) from India and gene association insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201(2):237-41.
- ⁵⁴ Pitout JD, Laupland KB. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- ⁵⁵ Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, i sur. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165-74.
- ⁵⁶ Hawkey PM. Prevalence and clonality of ESBL in Asia. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):159-65.
- ⁵⁷ Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended spectrum beta lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1): 33-41.

-
- ⁵⁸ Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, i sur. Prevalence of ESBLs in South America. *Clin Microb Infect* 2008;14 (Suppl 1):154-8.
- ⁵⁹ Mulvey MR, Bryce E, Boyd D, i sur. Ambler class A ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1204-14.
- ⁶⁰ Zong Z, Petridge SR, Thomas L. Dominance of blaCTX-M within an Australian extended spectrum beta lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 4198-202.
- ⁶¹ Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, i sur. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J antimicrob Chemother* 2007;59:165-174.
- ⁶² Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. An emerging public health concer. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-166.
- ⁶³ Canton R, Novais A, Valverde A, i sur. Prevalence and spread of ESBL enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):144-53.
- ⁶⁴ Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, i sur. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative anaerobic gram negative bacilli from patients with intra-abdominal infections worldwide from 2005-2007; results from SMART study. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:585-8.
- ⁶⁵ Ensor VM, Shahid M, Evans JT, Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta lactamases in enterobacteriaceae from Indian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1260-3.
- ⁶⁶ Pitout JDD. Infections with extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae. *Drugs* 2010;70:313-33.
- ⁶⁷ Coque T.M. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008;13(47):1-11.
- ⁶⁸ Labia, R. _analysis of the bla(toho) gene coding for toho-2 beta lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2576-2577.
- ⁶⁹ Ma, L., Y.Ishii, M.Ishiguro, H.Matsuzawa, K.Yamaguchi. Cloning and sequencing of the gene encoding toho-2 a class A beta lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1181-1186.
- ⁷⁰ Livermore, D.M. Beta-lactamases in laboratry and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-584.

-
- ⁷¹ Toleman, M.A., K.Rolston, R.N. Jones, T.R. Walsh. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2859-2863.
- ⁷² Bauernfeind, A., I.Stemplinger, R.Jungwirth, P.Mangold, S. Amann, E. Akalin, O. Ang, C.Bal, J.M. Casellas. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:616-620.
- ⁷³ Vahaboglu, H., R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskuncan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin, M. Otkun. 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;41:2265-2269.
- ⁷⁴ Decquier, J.D., F. Luzzaro, G. Amicosante, A. Toniolo, G.M. Rossolini. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2001;9:910-911.
- ⁷⁵ Paterson d., Bonomo R.A. Extended-Spectrum beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microb Rev* 2005;18:657-686.
- ⁷⁶ Yang K, Guglielmo BJ. Diagnosis and Treatment of Extended-Spectrum and AmpC beta-Lactamase-producing Organisms. *Ann Pharmacoth* 2007;41:1427-35.
- ⁷⁷ Albertini, M.T., C.Benoit, L. Berardi, Y.Berrouane, A.Boisivon, P.Cahen, i sur. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J Hosp Infect* 2002;52:107-113.
- ⁷⁸ Sekowska, A., G.Janicka, C.Klyszejko, M.Wojda, M.Wroblewski, M.Saymankiewicz. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. *Med Sci Monit* 2002;8:100-104.
- ⁷⁹ European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2005. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, 2006.
- ⁸⁰ Goosens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended spectrum beta lactamase and Amp-C producing enterobacteriaceae from

the MYSTIC program in Europe and United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;5:257-64.

⁸¹ Hackel M, Badal R, Bouchillon S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase production in Europe. In: Abstracts of the 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2008.

⁸² Babini G.S., -D.M. Livermore. Antimicrobial resistens amongst *Klebsiella* spp.collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:183-189.

⁸³ Livermore, D.M., M.Yuan. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum beta-lactamases amongst *Klebsiella* spp from intensive care units in Europe. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:409-424.

⁸⁴ Hanberger, H.J., A. Garcia-Rodriguez, M.Gobernado, H.Goossens, I.E. Nilsson, M.J. Struelens. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 6 European countries. French and Portuguese ICU Study Group. *JAMA* 1999;281:67-71.

⁸⁵ Fluit, A.C., M.E. Jones, F.J. Schmitz, J.Acar, R.Gupta, J.Verhoef. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* 2000;30:454-460.

⁸⁶ Gunsere, F., I.Mamikoglu, S. Ozturk, M.Yucesoy, K.Biberoglu, N. Yulug, i sur. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:373-378.

⁸⁷ Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1018-29.

⁸⁸ Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, i sur. Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3280-84.

⁸⁹ Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended spectrum beta lactamase and AmpC-producing enterobacteriaceae from

the MYSTIC program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:257-64.

⁹⁰ Yang K, Guglielmo J. Diagnosis and treatment of extended spectrum and AmpC β lactamase producing organisms. *Ann Pharmacother* 2007;41:1427-35.

⁹¹ National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004; issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85.

⁹² Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 533-7.

⁹³ Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3837-42.

⁹⁴ Brett M. Extended spectrum β lactamases among urinary *E. coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand in 2000., N. Zealand: Institute of Environmental Science & Research, 2000.

⁹⁵ Institute of Environmental Science and Research. ESBLs in enterobacteriaceae confirmed in 2005.g., New Zealand: ESR.

www.surv.esr.cri.nz/PDF_surveillance/Antimicrobial/ESBL/ESBL_2005.pdf.
(accessed 11 August 2009)

⁹⁶ Briggs S, Ussher J, Taylor S. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae at Middlemore Hospital. *N Z Med J* 2005;118:1563.

⁹⁷ Heffernan H, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK. Prevalence and types of extended spectrum β lactamases among urinary *E. coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:544-9.

⁹⁸ Tambić Andrašević A. Kontrola rezistencije bakterija na antibiotike u Hrvatskoj. *Infektološki glasnik* 2009;29:4,145-150.

⁹⁹ Bedenic B, Randegger CC, Stobberingh E, Hachler H. Molecular epidemiology of extended spectrum-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. *Eur J Microbiol Dis* 2001;20:505-508.

¹⁰⁰ Tambic Andrasevic A, Tambic T, Kalenic S, Jankovic V; Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance; Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002;8:14-18.

-
- ¹⁰¹ Tonkić M, Goić Barišić I, Punda Polić V. Prevalence and antimicrobial resistance of extended spectrum beta lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a university hospital in Split, Croatia. *Int Microbiol* 2005;8:119-24.
- ¹⁰² Tambić Andrašević A., Tambić T, Kalenić S, Katalinić-Janković V, Payerl Pal M. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj 2008. g. Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, 2008.
- ¹⁰³ Bošnjak Z, Bedenić B, Budimir A, Mareković M, Beader N, Vraneš J, Kalenić S. Prevalence of CTM-X producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals versus community. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl.4);257.
- ¹⁰⁴ Paterson, D.L., V.I. Yu. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis* 1999;29:1419-1422.
- ¹⁰⁵ Caswell, M.W. I. Phillips. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med* 1981;70:459-462.
- ¹⁰⁶ French, G. I., K. P. Shannon, N. Simmons. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 1996;34:358-363.
- ¹⁰⁷ Gaillot, O., C. Marucjouis, E. Abachin, F. Lecuru, G. Arlet, M. Siomonet, P. Berche. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminate ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol* 1998:1357-1360.
- ¹⁰⁸ Fiett, J., A. Palucha, B. Miaczynska, M. Stankiewicz, H. Przondo-Mordarska, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta lactamase-producing klebsiella. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1499-1505.
- ¹⁰⁹ Bradford, P. A., C.E. Cherubin, V. Idemyor, B.A. Rasmussen, K. Bush. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a signal isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:761-766.
- ¹¹⁰ Gniadkowski, M. I. Schneider, A. Palucha, R. Jungwirth, B. Mikiewicz, A. Bauernfeind. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-

lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;827-832.

¹¹¹ Sirot D, Sirot J, Labia R, i sur. Transferable resistance to third generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel B lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987;20:323-34.

¹¹² Bauernfeind A, Grimm H, Shweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990;18:294-8.

¹¹³ Bauernfeind A, Castellás JM, Goldberg M. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 1992;20:158-63.

¹¹⁴ Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB. Population based laboratory surveillance for *E. coli* producing ESBL: importance of community isolates with blaCTX-M genes. *Clin Infect Dis* 2004;38:1736-41.

¹¹⁵ Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, i sur. Novel plasmid mediated beta lactamase from *E. coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1243-6.

¹¹⁶ Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M type extended spectrum beta lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1): 33-41.

¹¹⁷ Bonnet R. Growing group of extended spectrum beta lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.

¹¹⁸ Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidim hydrolysing extended spectrum beta lactamase CTX-M 15 and of its structurally related beta lactamase CTX-M3. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1031-4.

¹¹⁹ Pitout JD, Laupland KB. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.

¹²⁰ Laupland KB, Church DL, Vidacovich J, i sur. Community onset ESBL *E. coli* : importance of international travel. *J Infect* 2008;57:441-8.

¹²¹ Rodríguez Bano J, Navarro MD. Extended spectrum beta lactamase in ambulatory care: a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):104-10.

¹²² Canton R, Coque TM. The CTX-M beta lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9 (5):466-75.

-
- ¹²³ Radice M, Power P, DiConza J, Gutking G. Early dissemination of CTX-M derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:602-3.
- ¹²⁴ Zong Z, Petridge SR, Thomas L. Dominance of blaCTX-M within an Australian extended spectrum beta lactamase gene pool. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52: 4198-202.
- ¹²⁵ Hawkey PM. Prevalence and clonality of ESBL in Asia. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):159-65.
- ¹²⁶ Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-91.
- ¹²⁷ Pitout JDD. Infections with extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae. *Drugs* 2010;70:313-33.
- ¹²⁸ Yang K, Guglielmo J. Diagnosis and treatment of extended spectrum and AmpC β lactamase producing organisms. *Ann Pharmacother* 2007;41:1427-35.
- ¹²⁹ Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, i sur. Emergence of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta lactamase in the community. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:52-9.
- ¹³⁰ Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blazquez. Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):5-11.
- ¹³¹ Paterson, DL. "Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38(4):341-5.
- ¹³² Harbarth S, Harris AD, Carmeli Y, Amore MH. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2001;33:1462-68.
- ¹³³ Koopman JS, Longini IM. The ecological effects of individual exposures and nonlinear disease dynamics in populations. *Am J Public Health* 1994;84:836-42.
- ¹³⁴ Lopez-Lozano JM, Monnet DL, Yague A, Burgos A, Gonzalo N, Campillos P i sur. Modeling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:21-31.
- ¹³⁵ Asensio, A, Oliver A, Gonzales-Diego P, Baquero, F, Perez-Diaz JC, Ros P, Cobo J, Palacios M, Lasheras D, Canton R. Outbreak of a multiresistant *K.pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as a risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000;30:55-60.

-
- ¹³⁶ Kim JY, Sohn JW, Park DW, Yoon YK, Kim YM, Kim MJ. Control of extended-spectrum beta-lactamase-producing *K.pneumoniae* using a computer-assisted management program to restrict third-generation cephalosporin use. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:416-21.
- ¹³⁷ Lee SO, Lee ES, Park SY, Kim SQ, Seo YH, Cho YK. Reduced use of third-generation cephalosporins decreased the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing *K.pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:832-37.
- ¹³⁸ Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagner JG, McCormac JG, Yu VL. International perspective study of *K.pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* 200;140:26-32.
- ¹³⁹ Knothe, H., P.Shah, V.Krcmery, M.Antal, S.Mitsuhashi. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983;11:315-317.
- ¹⁴⁰ Brun-Buisson, C., P.Legrand, A.Philippen, F.Montravers, M.Ansquer, J.Duval. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*;2(8554):302-6.
- ¹⁴¹ Sirot, D., J.Sirot, R.Labia, A.Morand, P.Courvalin, A.Darfeuille-Michaud, R.Perroux, R. Cluzel. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*; identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987;20:323-334.
- ¹⁴² Bhattachatjee A, Ranjan Sen M, Prakash P, Anupurba S. Role of β lactamase inhibitors in enterobacterial isolates producing extended spectrum β lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:309-14.
- ¹⁴³ Wener KM, Schechenr V, Gold HS, Wright SB, Carmeli Y. Treatment with Fluoroquinolones or with beta-lactam-beta-lactamase Inhibitor Combination Is a Risk Factor for Isolation of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* Species in Hospitalized Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2010-6.
- ¹⁴⁴ Harris AD, McGregor JC, Johnosn JA, Strauss SM, Moore AC, Standford HC, Hebden JN, Morris JG. Risk factors for colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and intensive care unit admission. *Emerg Infet Dis* 2007;13:1144-49.

-
- ¹⁴⁵ Yang K, Guglielmo J. Diagnosis and treatment of extended spectrum and AmpC β lactamase producing organisms. *Ann Pharmacother* 2007;41:1427-35.
- ¹⁴⁶ Tumbarello M, Sali M, Treccarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B i sur. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum-beta-lactamase Producing *Escherichia coli*: Risk Factors for Inadequate Initial Antimicrobial Therapy. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2008;52:3244-52.
- ¹⁴⁷ Tumbarello M, Spanu T, Di Bidino R, Marchetti M, Ruggeri M, Treccarichi EM, i sur. The Costs of Bloodstream Infections Caused by *Escherichia coli* and Influence of Extended-Spectrum beta-Lactamase Production and Inadequate Initial Antibiotic Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4085-91.
- ¹⁴⁸ Wener KM, Schechner V, Gold HS, Wright, Carmeli Y. Treatment with Fluoroquinolones or with beta-Lactam-Beta-Lactamase Inhibitor Combination Is a Risk Factor for Isolation of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-producing *Klebsiella* Species in Hospitalized Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2010-16.
- ¹⁴⁹ Treccarichi EM, Tumbarello M, Spanu T, I sur. Incidence and clinical impact of extended-spectrum-beta-lactamase production and fluorokinolone resistance in bloodstream infections caused by *E.coli* in patients with hematological malignancies. *J Infect* 2009;58:299-307.
- ¹⁵⁰ Ortega M, Marco F, Soriano A, I sur. Analysis of 4758 *E.coli* bacteraemia episodes: predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:568-74.
- ¹⁵¹ Lee CI, Lee NY, Yan JJ, I sur. Extended-spectrum beta-lactamase-producing phenotype signifies a poor prognosis for patients with cefpodoxime-resistant *E.coli* or *K.pneumoniae* bacteriemia. *J Microbiol Immunol Infect* 2009;42:303-309.
- ¹⁵² Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-166.
- ¹⁵³ Rodriguez-Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, i sur. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 2008;168:1897-1902.

-
- ¹⁵⁴ Kuster SP, Hasse B, Huebner V, et al. Risk factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* at a tertiary care university hospital in Switzerland. *Infection* 2010;38:33-40.
- ¹⁵⁵ Freeman JT, McBride SJ, Heffernan H, et al. Community-onset genitourinary infection due to CTX-M-15-producing *E. coli* among travelers to the Indian subcontinent in New Zealand. *Clin Infect Dis* 2008;47:689-692.
- ¹⁵⁶ Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microb Rev* 2005;18:657-686.
- ¹⁵⁷ Rodriguez-Bano J, Picon E, Gijon P, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* 2010;50:40-48.
- ¹⁵⁸ Ben-Ami R, Rodriguez-Bano J, Arslan H, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2009;49:682-90.
- ¹⁵⁹ Canton R, Novais A, Valverde A, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008,14 (Suppl.1):144-153.
- ¹⁶⁰ Rodriguez-Bano J, Lopez-Cerero L, Navarro MD, Diaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1142-1149.
- ¹⁶¹ Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)- 18th European Congress. Drug resistance among Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Drugs* 2008;11:409-411.
- ¹⁶² Valverde A, Coque TM, Garcia-San Miguel L, Baquero F, Canton R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:64-72.
- ¹⁶³ Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 (Suppl.1):111-116.
- ¹⁶⁴ Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. An emerging public health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-166.

-
- ¹⁶⁵ Ariffin, H., P. Navaratnam, M. Mohamed, A. Arasu, W. A. Abdullarth, C.L. Lee, L. H. Peng. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *Int J Infect* 2000;4:21-25.
- ¹⁶⁶ Arlet, G., M. Rouveau, I. Casin, P.J. Bouvet, P.H. Lagrange, A. Philippon. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol* 1994;32:2553-2558.
- ¹⁶⁷ Bisson, G., N. O. Fishman, J. B. Patel, P. H. Edelstein, E. Lautenbach. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:254-260.
- ¹⁶⁸ D'Agata, E. L. Venkataraman, P. DeGirolami, L. Weigel, M. Samore, F. Tenover. The molecular and clinical epidemiology of enterobacteriaceae-producing extended-spectrum beta-lactamase in a tertiary care hospitals. *J Infect* 1998;36:279-285.
- ¹⁶⁹ De Champs C., D. Rouby, D. Guelon, J. Sirot, D. Sirot, D. Beytout, J. M. Gourgand. A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. *J Hosp Infect* 1991;18:5-13.
- ¹⁷⁰ Lautenbach, E., J. B. Patel, W. B. Biker, P. H. Edelstein, N. O. Fishman. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001;32:1163-1171.
- ¹⁷¹ Lucet, J. C., S. Chevret, D. Decre, D. Vanjak, A. Macrez, J. P. Bedos, M. Wolf, B. Regnier. Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis* 1996;22:430-436.
- ¹⁷² Mangeney, N., P. Niel, G. Paul, E. Faubert, S. Hue, C. Dupeyron, F. Louaru, G. Leluan. A 5-year epidemiological study of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a medium- and long-stay neurological unit. *J Appl Microbiol* 2000;88:504-511.
- ¹⁷³ Patterson D. I., W. C. Ko, A. Von Gottberg, S. Mohapatra, J. M. Casellas, H. Goossens, L. Mulazimoglu, G. Trenholme, i sur. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteriemia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Anjn Intern Med* 2004;26-32.

-
- ¹⁷⁴ Penaj, c., M. Pujol, A. Ricart, Cj. Ardanuy, J. Ayats, J. Linares, i sur. risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect* 1997;35:9-16.
- ¹⁷⁵ Piroth, L., H. Aube, J. M. Djoise, M. Vincent-Martin. Spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are beta-lactamase inhibitors of therapeutic value? *Clin Infect Dis* 1998;27:76-80.
- ¹⁷⁶ Schiappa, D. A., M. K. Hayden, M. G. Matushek, F. N. Hashemi, J. Sullivan, K. Y. Smith, D. Miyashiro, J. P. Quinn, R. A. Weinstein, i sur. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infections: a case-control and molecular epidemiologic investigation. *J Infect Dis* 1996;174:529-536.
- ¹⁷⁷ Wiener, J., J. P. Quinn, P. A. Bradford, R. V. Goering, C. Natharn, K. Bush, R. A. Weinstein. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 517-523.
- ¹⁷⁸ Jacoby G, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 2005;352:380-391.
- ¹⁷⁹ Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, i sur. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006;42:37-45.
- ¹⁸⁰ Pfaller M, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 2006;42 (Suppl.4):153-163.
- ¹⁸¹ Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, Perez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1089-1094.
- ¹⁸² Gudiol C, Calatayud L, Garcia-Vidal C, i sur. Bacteriaemi adue to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in cancer patients: clinical features, risk factors, molecular epidemiology and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:333-41.
- ¹⁸³ Pena C, Pujol M, Ricart i sur. Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β –lactamase in the intensive care unit. *J Hosp Infect* 1197;35:9-16.

-
- ¹⁸⁴ Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman N. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001;32:1162-1171.
- ¹⁸⁵ Valverde A, Coque TM, Garcia-San Miguel L, Baquero F, Canton R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: a long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:64-72.
- ¹⁸⁶ Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, i sur. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* 2006;42:37-45.
- ¹⁸⁷ Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-686.
- ¹⁸⁸ Canton R, Novais A, Valverde A, i sur. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):144-153.
- ¹⁸⁹ Schwaber MJ, Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in enterobacteriaceae bacteremia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:913-920.
- ¹⁹⁰ Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, i sur. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Available Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006;42:657-668.
- ¹⁹¹ Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM i sur. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2000; 30:473-478.
- ¹⁹² Pitout JD, Laupland KB. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- ¹⁹³ Paterson DL, Ko WC, Von Gotterberg A, i sur. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended spectrum beta lactamase. *Clin Infect Dis* 2004;39:31-7.

-
- ¹⁹⁴ Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Janković V, and the Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. *Emerg Infect Dis* 2002;8:14-8.
- ¹⁹⁵ Peterson LR. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: the role of piperacillin-tazobactam. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 4):181-4.
- ¹⁹⁶ Lopez Cerrero L, Picon E, Morillo C, i sur. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended spectrum beta lactamase producing and extended spectrum beta lactamase non producing *E. coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):132-6.
- ¹⁹⁷ Thompson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam and the inoculum effect in tests with extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3528-54.
- ¹⁹⁸ Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, i sur. Prevalence of ESBLs in South America. *Clin Microb Infect* 2008;14 (Suppl 1):154-8.
- ¹⁹⁹ Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by enterobacteriaceae producing ESBLs. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:460-3.
- ²⁰⁰ del mar Thomas M, Cartelle M, Pertega S, i sur. Hospital outbreak caused by a carbapenem resistant strain of *Acinetobacter baumannii*; patient prognosis and risk factor for colonisation and infection. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:540-6.
- ²⁰¹ Hyle EP, Lipworth AD, Zaoutis TE, Nachamkin I, Fishman NO, Bilker WB, Mao X, Lautenbach E. Risk factor for increasing multidrug resistance among extended spectrum B lactamase producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. *Clin Infect Dis* 2005;40:1317-24.
- ²⁰² Rahal JJ, Urban C, Horn D, i sur. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA* 1998;280:1233-7.
- ²⁰³ Urban C, Go E, Mariano N, i sur. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*. *J Infect Dis* 1993;167:448-51.
- ²⁰⁴ Mac Kenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, Amyes SGB, Gould IM. Emergence of a carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1997;350:783.

-
- ²⁰⁵ Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th Informational Supplement. M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- ²⁰⁶ Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest* 2000;118:146-155.
- ²⁰⁷ Who Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2007. Oslo,2006. Available at: <http://www.whocc.no/filearchive/publications/2011guidelines.pdf>
- ²⁰⁸ Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829.
- ²⁰⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2005.
- ²¹⁰ Thompson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: Comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1877-1882.
- ²¹¹ Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:191-28.
- ²¹² Goering R V. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, in *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, Persing, Editor. 2004, ASM Press: Washington D.C. p. 185-196.
- ²¹³ Kaufman ME. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Woodford N and Johnsons A, eds. *Molecular bacteriology. Protocols and clinical applications*. 1st ed. New York: Humana Press Inc. Totowa, 1998: 33-51.
- ²¹⁴ Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al .Interprinting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.

-
- ²¹⁵ Soll D , Lockhart S, Pujol S. *Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms*. 8 ed, ed. P. Murray., Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. 2003, Washington DC:asm Press.139-159.
- ²¹⁶ Ju-Hsin Chia, Chishih Chu, Lin-Hui Su, Cheng-Hsun Chiu, An-Jing Kuo, Chien-Feng Sun. Development of a Multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for Detection of SHV and CTX-M β -Lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4486-4491.
- ²¹⁷ Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, and Arlet G. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol. Lett.*2002;209:161-168.
- ²¹⁸ Hsueh PR, Chen WH, Luh KT. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:463-471.
- ²¹⁹ Reinhardt A, Kohler T, Wood P, Rohner P, Dumas JL, Ricou B, van Delden C. Development and Persistence of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a Longitudinal Observation in Mechanically Ventilated Patients: *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(4):1341-1350.
- ²²⁰ Hocquet D, Muller A, Blanc K, Plesiat P, Talon D, Monnet DL i sur. Relationship between Antibiotic Use and Incidence of MexXY-OprM Overproducers among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(3):1173-1175.
- ²²¹ Bedenic B, Goic-Barisic I, Budimir A, Tonkic M, Mihajkevic LJ, Novak A, Sviben M, Plecko V, Punda-Polic V, Kalenic S. Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of selected gram-negative bacilli from two Croatian hospitals: MYSTIC study results. *J Chemother* 2010;22:147-52.
- ²²² <http://www.abdn.ac.uk/arpac/index.htm>
- ²²³ http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2007_EARSS_Annual_Report.pdf

-
- ²²⁴ Pena C, Gudiol C, Tubaou F, Sabalis M, Pujol M, Dominguez MA, Calatayud L, Ariza J, Gudiol F. Risk-factors for acquisition of extended-spectrum beta-lactamase producing *E.coli* among hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:279-284.
- ²²⁵ Korten V, Murray BE. Impact of the fluorquinolones on gastrointestinal flora. *Drugs* 1993;45:125-33.
- ²²⁶ Ferech M, Coenen S, Malhotra-Kumar S, Dvorakova K, Hendricks E, Suetens C, Goossens H. ESAC Project Group European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:423-27.
- ²²⁷ Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluorquinolone use. *JAMA* 2003;289:885-888.
- ²²⁸ Huang Y, Zhuang S, Du M. Risk factors for nosocomial infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: variability by site of infection. *Arch Intern med* 2005;35:339-345.
- ²²⁹ Serefhanoglu K, Turan H, Timurkaynak E, Arslan H. Bloodstream infections caused by ESBL producing *E.coli* and *K.pneumoniae*: Risk Factors for Multidrug-Resistance. *BJID* 2009;13:403-7.
- ²³⁰ Nguyen LJ, Okamoto M, McKamy S, Lieberman JM. Impact of empiric antibiotic use on development of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase bacteria in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis* 2008;27:314-8.
- ²³¹ Kalenić S, Tambić Andrašević A. European Antibiotic Surveillance System (EARSS). U: Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj 2007. g., Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, 2008
- ²³² Hoyen CK, Pultz NJ, Paterson DL, Aron DC, Donskey CJ. Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3610-2.
- ²³³ Ramphal R, Ambrose PG. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. *Clin Infect Dis* 2006;42:164-172.
- ²³⁴ Thomson KS. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerg Infect Dis* 2001;7:333-336.

-
- ²³⁵ Song W, Moland ES, Hanson ND, Lewis JS, Jorgensen JH, Thomson KS. Failure of cefepime therapy in treatment of *K.pneumoniae* bacteriemia. *J Clin Microbiol* 2005;43:4891-94.
- ²³⁶ Anderson DJ, Engemann JJ, Harrell LJ, Carmeli Y, Reller LB, Kaye KS. Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1715-1720.
- ²³⁷ Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Rios MJ, Hernandez JR, Pascual A. Bacteriemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006;43:1407-14.
- ²³⁸ Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and economic impact of bacteriemia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1257-62.
- ²³⁹ Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest* 2000;1118:146-155.
- ²⁴⁰ Cordery RJ, Roberts CH, Cooper SJ, Bellinghan G, Shetty N. Evaluation of risk factors for the acquisition of bloodstream infections with extended-spectrum beta-lactamase producing *E.coli* and *K.pseicis* in the ICU: antibiotic management and clinical outcome. *J Hosp Infect* 2008;68:108-115.
- ²⁴¹ Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, i sur. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008;36:296-327.
- ²⁴² Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, i sur. Rapid spread of carbapenem-resistant *K.pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Int Med* 2005;165:1430-5.
- ²⁴³ Healt Protection Agency. Health Protection Report 2009;3(4).
<http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2009/news0409.htm#enterora>
- ²⁴⁴ Rello J, Sa-Borges M, Correa H, i sur. Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites: implications for antimicrobial prescribing practices. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:608-613.

-
- ²⁴⁵ Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by enterobacteriaceae producing ESBLs. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:460-3.
- ²⁴⁶ Paterson DL, Ko WC, Von Gotterberg A, i sur. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended spectrum beta lactamase. *Clin Infect Dis* 2004;39:31-7.
- ²⁴⁷ Bassetti M, Righi E, Fasce R, i sur. Efficacy of ertapenem in the treatment of early ventilator-associated pneumonia caused by extended spectrum beta lactamase producing organisms in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:433-5.
- ²⁴⁸ Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe K. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing EC and KP: Risk factors for mortality and treatment outcome with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4574-81.
- ²⁴⁹ Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Argerich MJ, Garrigosa F, Ariza J, Fudiol F. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4086-4095.
- ²⁵⁰ Erdeljic V, Francetic I, Bosnjak Z, Budimir A, Kalenic S, Bielen L, Makar-Ausperger K, Likic R. Distributed lags time series analysis versus linear correlation analysis (Pearson's r) in identifying the relationship between antipseudomonal antibiotic consumption and the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a single Intensive Care Unit of a tertiary hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):467-71.
- ²⁵¹ Bosnjak Z, Bedenic B, Mazzariol A, Jarza-Davila N, Suto S, Kalenic S. VIM beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* 2010;42(3):193-7.
- ²⁵² Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, i sur. Ertapenem resistance among extended spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2009;47:969-74.
- ²⁵³ Cuzon G, Naas T, Guilbert M, Nordmann P. In vivo selection of imipenem-resistant *K.pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:265-8.

-
- ²⁵⁴ Kearn SJ. Doripenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 2008;68:2021-57.
- ²⁵⁵ Pitout JDD. Infections with extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae. *Drugs* 2010;70:313-33.
- ²⁵⁶ Bin C, Hui W, Renyuan Z, i sur. Outcome of cephalosporin treatment of bacteremia due to CTX-M-type ESBL producing *E. coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:351-7.
- ²⁵⁷ Jones RN, Biedenbach DJ, Gales AC. Sustained activity and spectrum of selected extended spectrum beta lactams (carbapenems and cefepime) against *Enterobacter* spp. and ESBL producing *Klebsiella* spp. Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (USA, 1997-2000). *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:1-7.
- ²⁵⁸ Zanetti G, Bally F, Greub G, i sur. Cefepime *versus* imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3442-76.
- ²⁵⁹ Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJ. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:767-772.
- ²⁶⁰ Rodrigues Bano J, Alcalá JC, Cisneros JM, i sur. Community infections caused by extended spectrum beta lactamase producing *E. coli*. *Arch Intern Med* 2008;168:1897-902.
- ²⁶¹ Lagace Wiens PR, Nichol KA, Nicolle LE, i sur. Treatment of lower urinary tract infection caused by multidrug resistant ESBL producing *E. coli* with amoxicillin/clavulanate: case report and characterisation of the isolate. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1262-3.
- ²⁶² Amyes SGB, Miles RS. Extended spectrum beta lactamases: the role of inhibitors in therapy. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:415-7.
- ²⁶³ Ambrose PG, Bhavnani SM, Jones RN. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of cefepime and piperacillin-tazobactam against *E. coli* and *K. pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamase : report from the ARREST program. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1643-46.

-
- ²⁶⁴ Saely S, Kaye KS, Fairfax MR, Chopra T, Pogue J. Investigating the impact of the definition of previous antibiotic exposure related to isolation of extended spectrum beta-lactamase-producing *K.pneumoniae*. *Am J Infect Control* 2011; 39(5):390-5.
- ²⁶⁵ Pitout JD, Le P, Church DL, i sur. Antimicrobial susceptibility of well characterised multiresistant CTX-M producing *E. coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:333-8.
- ²⁶⁶ Kim YK, Pai H, Lee HJ, i sur. Bloodstream infections by ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1481-91.
- ²⁶⁷ Johnson JS, Ernst EJ, Moores KG. Is double coverage of gram-negative organisms necessary? *Am J Health Syst Pharm* 2011;68:119-24.
- ²⁶⁸ Pitout JD. Multiresistant enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6:657-69.
- ²⁶⁹ Pitout JD, Laupland KB. Extended spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-66.
- ²⁷⁰ Vranic-Ladavac M, Bosnjak Z, Beader N, Barisic N, Kalenic S, Bedenic B. Clonal spread of CTX-M-15 producing *K.pneumoniae* in a Croatian hospital. *J Med Microbiol* 2010;59:1069-78.
- ²⁷¹ Pangon B, Bizet C, Bure A, i sur. *In vivo* selection of a cephamycin resistant, porin deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM 3 beta lactamase. *J Infect Dis* 1989;159:1005-6.
- ²⁷² Lee CH, Su LH, Tang YF, i sur. Treatment of ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006;50:498-504.
- ²⁷³ Lee CH, Chu C, Liu JW, Chen YS, Chiu CJ, Su LH. Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of blaDHA-1 leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of *K.pneumoniae* producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:410-3.
- ²⁷⁴ Garau J. Other antimicrobials of interest in era of extended spectrum beta lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 1):198-202.

-
- ²⁷⁵ de Cueto M, Hernandez JR, Lopez Cerero L, i sur. Activity of fosfomicin against extended spectrum beta lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2006;24:613-6.
- ²⁷⁶ Galatti L, Sessa A, Mazzaglia G, i sur. Antibiotic prescribing for acute and recurrent cystitis in primary care: a 4-year descriptive study. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:551-6.
- ²⁷⁷ Oteo J, Orden B, Bautista V. CTX-M-15 producing urinary *E. coli* of 25b-ST 131 phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:712-7.
- ²⁷⁸ Puerto AS, Fernandez JG, del Castillo D, i sur. *In vitro* activity of beta lactam and non beta lactam antibiotics in ESBL producing clinical isolates of *E. coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;54:135-9.
- ²⁷⁹ Pitout JD, Campbell L, Church DL, i sur. Molecular characteristics of travel related ESBL producing *E. coli* isolates from the Calgary health region. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2539-43.
- ²⁸⁰ Pitout JD, Le P, Church DL, i sur. Antimicrobial susceptibility of well characterised multiresistant CTX-M producing *E. coli*: failure of automated systems to detect resistance to piperacillin/sulbactam. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:333-8.
- ²⁸¹ Zahar JR, Lortholary O, Martin C, i sur. Addressing the challenge of ESBLs. *Curr Opin Invest Drugs* 2009;10:172-80.
- ²⁸² Nicolle LE, Mulvey MR. Successful treatment of CTX-M ESBL producing *E. coli* relapsing pyelonephritis with long term pivmecillinam. *Scand J Infect Dis* 2007;39:748-9.
- ²⁸³ Evans RS, Classen DC, Pestotnik SL, i sur. Ig empiric antibiotic selection using computer decision support. *Arch Intern Med* 1994;154:878-884.
<http://www.whocc.no/filearchive/publications/2011guidelines.pdf>

ŽIVOTOPIS

Viktorija Erdeljić rođena je 1. lipnja 1972. godine u Augsburgu u Njemačkoj. Osnovnu i srednju školu završila je u Đakovu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1992. godine a diplomirala je 1999. godine.

Obvezni pripravnički staž obavila je u Domu zdravlja Trešnjevka, a državni ispit pri Ministarstvu zdravstva položila je 2000. godine.

Specijalizaciju iz kliničke farmakologije i toksikologije započela je 2002. godine a specijalistički ispit položila je 2006. godine. Nakon specijalističkog ispita nastavila je raditi na Zavodu za kliničku farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Područja od posebnog interesa uključuju potrošnju antibiotika i bakterijsku rezistenciju, medicinsku statistiku, alergije na lijekove, lijekove u trudnoći i dojenju te kliničke studije I i II faze.

Stručni studij iz kliničke i farmakologije pohađala je od 2002. -2003. godine te uspješno položila sve potrebne ispite.

Znanstveni studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisala je 2002. godine te je uspješno položila sve potrebne ispite.

Sudjelovala je aktivno na brojnim domaćim i stranim kongresima, simpozijima i tečajevima trajne edukacije.

Sudjeluje kao predavač u nastavi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu za studente diplomskog (Interna medicina, Klinička farmakologija) i postdiplomskih studija (Klinička farmakologija, Opća medicina, Urologija, Dermatologija) te sveučilišnom studiju sestrinstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (Farmakologija) i studiju sestrinstva na Visokoj tehničkoj školi u Bjelovaru (Farmakologija).

Instruktor je za tečaj iz Naprednih mjera održavanja života Hrvatskog društva za reanimatologiju.

Član je Hrvatskog društva za kliničku farmakologiju i terapiju (blagajnica) te Sekcije za farmakoekonomiku (blagajnica), Europskog društva za kliničku farmakologiju i terapiju, Europskog društva za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti, Europske akademije za alergiju i kliničku imunologiju te Međunarodnog društva za farmakoekonomiku i istraživanje ishoda.

Član je Povjerenstva za lijekove Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Ukupno je publicirala 17 znanstvenih radova (7 kao prvi autor) od kojih je 15 objavljeno u časopisima indeksiranim u *Current Contents* (6 kao prvi autor).

Osobni podaci:

Viktorija Erdeljić

Andrije Žaje 40, 10 000 Zagreb

Tel. 091 505 99 81

E-mail: verdeljic@gmail.com

POPIS PUBLIKACIJA

1. Erdeljić V, Francetić I, Likić R, Makar-Aušperger K, Macolić-Šarinić V, Huić M. Pain relief in medical patients: does clinical judgment and prescribing knowledge suffice? *Coll Antropol* 2011;35:363-8.
2. Ivkić G, Erdeljić V. Could a neurological disease be a part of Mozart's pathography? *Coll Antropol* 2011;35 (Suppl1):169-73.
3. Erdeljić v, Francetić I, Bošnjak Z, Budimir A, Kalenić S, Bielen L, Makar-Aušperger K, Likić R. Distributed lags time series analysis versus linear correlation analysis (Pearson's r) in indentifying the relationship between antipseudomonal antibiotic consumption and the susceptibility of *P.aeruginosa* isolates in a single Intensive Care Unit of a tertiary hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:467-71.
4. Erdeljić V, Francetić I, Vlahović-Palčevski V, Radošević N, Makar-Aušperger, Likić R. Avoiding concomitant prescription of drugs with a potential for interaction: mission impossible? *Int J Clin Pharm Ther.* 2010;48(12):821-9..
5. Bacic-Vrca V, Marusic S, Erdeljic V, Falamic S, Gojo-Tomic N, Rahelic D. The incidence of potential drug-drug interactions in elderly patients with arterial hypertension. *Pharm Wordl Sci* 2010;48:821-9.
6. Erdeljić V, Francetić I, Makar-Aušperger K, Likić R, Radačić-Aumiler M. Clinical pharmacology consultation: a better answer to safety issues of drug therapy during pregnancy? *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66(10):1037-46.
7. Erdeljic V, Francetic I, Likic R, Bakran I, Makar-Ausperger K, Simic P. Is referring patients with a positive history of allergic drug reactions or atopy for allergy testing to local anesthetics justified? *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009 Apr;31(3):177-82.
8. Bekić M, Davila S, Hrskanović M, Bekić M, Seiwert S, Erdeljić V, Capak D, Butković V. Application of a novel bone osteotomy plate leads to reduction in heat-induced bone tissue necrosis in sheep. *Coll Antropol.* 2008 Dec;32(4):1229-37.

-
9. Herceg M, Jukić V, Vidović D, Erdeljić V, Celić I, Kozumplik O, Bagarić D, Silobrcić Radić M. Two-year rehospitalization rates of patients with newly diagnosed or chronic schizophrenia on atypical or typical antipsychotic drugs: retrospective cohort study. *Croat Med J.* 2008 Apr;49(2):215-23.
10. Francetić I, Kalenić S, Huić M, Mercep I, Makar-Ausperger K, Likić R, Erdeljić V, Tripković V, Simić P. Impact of aminoglycoside cycling in six tertiary intensive care units: prospective longitudinal interventional study. *Croat Med J.* 2008 Apr;49(2):207-14.
11. Likić R, Francetić I, Bilusić M, Erdeljić V, Makar-Ausperger K, Junacko C, Simić P. Antibiotic use optimization program in the largest Croatian university hospital--benefits of restrictions on unlimited antibiotic use. *Coll Antropol.* 2007 Mar;31(1):241-6.
12. Francetic I, Bilusic M, Macolic-Sarinic V, Huic M, Mercep I, Makar-Ausperger K, Erdeljic V, Mimica S, Baotic I, Simic P. Inadequate use of preventive strategies in patients receiving NSAIDs. *Clin Drug Investig.* 2005;25(4):265-70.
13. Erdeljic V, Francetic I, Macolic Sarinic V, Bilusic M, Makar Ausperger K, Huic M, Mercep I. Use of gastroprotective agents in recommended doses in hospitalized patients receiving NSAIDs: a drug utilization study. *Pharm World Sci.* 2006 Oct;28(5):318-25.
14. Babić Z, Deskin M, Muacević-Katanec D, Erdeljić V, Misigoj-Duraković M, Metelko Z. Estimation of physical activity by different questionnaires in overweight subjects and patients with Type 2 diabetes mellitus: relationship with anthropometric and metabolic variables. *Diabetes Nutr Metab.* 2004 Oct;17(5):280-9.
15. Erdeljić V, Francetić I, Macolić Sarinić V, Bilusić M, Huić M, Mercep I, Makar-Ausperger [Evaluation of the justification for antibiotic use at the Internal Medicine Clinic of the Clinical Hospital in Zagreb] K. *Acta Med Croatica.* 2004;58(4):293-9. Croatian.
16. Hebrang A, Henigsberg N, Erdeljic V, Foro S, Vidjak V, Grga A, Macek T. Privatization in the health care system of Croatia: effects on general practice accessibility. *Health Policy Plan.* 2003 Dec;18(4):421-8.

17. Hebrang A, Henigsberg N, Erdeljić V, Foro S, Turek S, Zlatar M. [Privatization of the Croatian health care system: effect on indicators of health care accessibility in general medicine] *Lijec Vjesn.* 2002 Aug-Sep;124(8-9):239-43. Croatian.