

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra GABRIJEL

**OBČUTLJIVOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA
NOVI GLICILCIKLINSKI ANTIBIOTIK TIGECIKLIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra GABRIJEL

**OBČUTLJIVOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA NOVI
GLICILCIKLINSKI ANTIBIOTIK TIGECIKLIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SUSCEPTIBILITY OF BACTERIAL ISOLATES TO A NEW
GLYCYLCYCLINE ANTIBIOTIC TIGECYCLINE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij (RSP) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 23. 06. 2008 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med. in za recenzentko prof. dr. Evo Ružič-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružič-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIČ-SABLJIĆ, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Gabrijel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.24 + 579.26: 615.33 (043) = 163.6
- KG antibiotiki/tigeciklin/občutljivost za antibiotike/proti meticilinu odporen
Staphylococcus aureus/MRSA/proti vankomicinu odporni enterokoki/VRE/laktamaze
beta z razširjenim spektrom delovanja/ESBL/mikrodilucijska metoda
- AV GABRIJEL, Petra
- SA SEME, Katja (mentorica)/RUŽIČ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
- LI 2008
- IN OBČUTLJIVOST BAKTERIJSKIH IZOLATOV ZA NOVI GLICILCIKLINSKI
ANTIBIOTIK TIGECIKLIN
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 61 str., 22 pregl., 21 sl., 39 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Po pojavu večkratno odpornih bakterijskih izolatov so se ti hitro razširili in postali eden glavnih problemov v mnogih bolnišnicah po vsem svetu. Med njimi so najbolj znani proti meticilinu odporni izolati *S. aureus* (MRSA), proti vankomicinu odporni izolati enterokokov (VRE) in enterobakterije, ki izločajo laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja (ESBL). Zdravljenje okužb z njimi je velikokrat problematično in je potreba po odkrivanju novih učinkovitih antibiotikov vse večja. Eden zadnjih razvitih protibakterijskih sredstev je tigeciklin, ki spada v novo skupino glicilciklinskih antibiotikov s širokim spektrom delovanja. V Sloveniji je tik pred pridobitvijo dovoljenja za promet. V raziskavi smo želeli ugotoviti, kakšna je občutljivost najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb v Sloveniji za novi antibiotik tigeciklin. V raziskavo smo vključili 200 bakterijskih izolatov, ki smo jih testirali z mikrodilucijsko metodo. Med 135 testiranimi izolati bakterijskih vrst *S. aureus*, *S. agalactiae*, rodu *Enterococcus* in enterobakterij, za katere so oblikovani kriteriji za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin, je bilo 134 (99,3 %) izolatov občutljivih in en izolat mejno občutljiv za tigeciklin ter niti eden izolat odporen proti tigeciklinu. Tigeciklin je bil *in vitro* dobro učinkovit proti izolatom *S. aureus*, vključno z MRSA (MIK₉₀ = 0,25 µg/mL), enterokokov, vključno z VRE (MIK₉₀ = 0,12 µg/mL), *S. agalactiae* (MIK₉₀ = 0,03 µg/mL), *S. pneumoniae* (MIK₉₀ = 0,03 µg/mL), *H. influenzae* (MIK₉₀ = 0,5 µg/mL) in enterobakterijam, vključno z izolati, ki izločajo ESBL in so *in vitro* dobro občutljivi za tigeciklin. Tigeciklin je bil v primerjavi s prej naštetimi bakterijami *in vitro* manj učinkovit proti izolatom *A. baumannii* (MIK₉₀ = 1 µg/mL) in *P. aeruginosa* (MIK₉₀ = 16 µg/mL). S testiranjem 67 večkratno odpornih bakterijskih izolatov MRSA, VRE, *E. coli* in *K. pneumoniae*, ki so izločale ESBL, ter *S. maltophilia* smo primerjali disk difuzijsko metodo in metodo difuzijskega gradienta za določanje občutljivosti za tigeciklin in ugotovili, da je metoda difuzijskega gradienta ustrežnejša za rutinsko testiranje občutljivosti tigeciklina v mikrobiološkem laboratoriju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.24 + 579.26: 615.33 (043) = 163.6
- CX antibiotics/tigecycline/antimicrobial susceptibility/methicillin-resistant
Staphylococcus aureus/MRSA/vancomycin-resistant enterococci/VRE/extended
spectrum betalactamases/ESBL/microdilution method
- AU GABRIJEL, Petra
- AA SEME, Katja (supervisor)/RUŽIČ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2008
- TY SUSCEPTIBILITY OF BACTERIAL ISOLATES TO A NEW
GLYCYLCYCLINE ANTIBIOTIC TIGECYCLINE
- DT Graduation Thesis (University Studies)
- NO XIII, 61 p., 22 tab., 21 fig., 39 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB After the emergence of resistant bacterial isolates, they spread quickly and became one of the main problems in many hospitals around the world. The most frequent and important of them are methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), vancomycin-resistant enterococci (VRE) and enterobacteria that produce extended spectrum betalactamases (ESBL). Therapy of infections caused by multidrug resistant bacteria is difficult and therefore the need for development of new effective antibiotics is constantly growing. Tigecycline is one of recently developed antimicrobials, which belongs to a novel group of broad-spectrum glycylycylines. It has not been used yet in Slovenia but it is in the process to obtain a distribution licence. The main purpose of our study was to determine susceptibility of the most frequent bacterial pathogens to tigecycline. 200 bacterial isolates were included in the study. They were tested by microdilution method. 134 (99,3 %) out of 135 tested isolates of *S. aureus*, *S. agalactiae*, enterococci and enterobacteria according to the guidelines published by FDA, were susceptible to tigecycline. One of them was intermediately susceptible. There were no tigecycline resistant isolates. *In vitro* activity of tigecycline against *S. aureus* including MRSA (MIK₉₀ = 0,25 µg/mL), enterococci including VRE (MIK₉₀ = 0,12 µg/mL), *S. agalactiae* (MIK₉₀ = 0,03 µg/mL), *S. pneumoniae* (MIK₉₀ = 0,03 µg/mL), *H. influenzae* (MIK₉₀ = 0,5 µg/mL) and enterobacteria including ESBL positive isolates was good. However, tigecycline was *in vitro* less active against *A. baumannii* (MIK₉₀ = 1 µg/mL) and *P. aeruginosa* (MIK₉₀ = 16 µg/mL). Additionally, tigecycline susceptibility was tested in 67 MRSA, VRE, ESBL positive *E. coli* and *K. pneumoniae* and *S. maltophilia* isolates using the disc diffusion method and the E-test. It was found out that the E-test is more accurate and therefore more suitable for testing the susceptibility of tigecycline in the microbiological laboratory.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ANTIBIOTIKI	4
2.1.1 Zaviralci sinteze celične stene	4
2.1.2 Zaviralci sinteze znotrajceličnih proteinov	6
2.1.3 Zaviralci sinteze nukleinskih kislin	7
2.1.4 Zaviralci delovanja citoplazemske membrane	8
2.2 PRIDOBITEV ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM	8
2.3 VEČKRATNO ODPORNE BAKTERIJE	9
2.3.1 Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.2 Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja	10
2.3.3 Enterokoki, odporni proti glikopeptidom	11

2.4	RAZVOJ NOVIH ANTIBIOTIKOV	13
2.4.1	Tigeciklin	13
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	BAKTERIJSKI IZOLATI	17
3.2	TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV	17
3.3	METODE	20
3.3.1	Priprava uporabljenih gojišč	20
3.3.2	Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske suspenzije	20
3.3.3	Inokulacija in rehidracija panelov	21
3.3.4	Metoda difuzijskega gradienta	23
4	REZULTATI	25
4.1	MIKRODILUCIJSKA METODA	25
4.1.1	Občutljivost bakterijskih izolatov za tigeciklin	25
4.1.2	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>S. pneumoniae</i>	27
4.1.3	Občutljivost bakterijskih izolatov rodu <i>Enterococcus</i>	29
4.1.4	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>S. aureus</i>	30
4.1.5	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>S. agalactiae</i>	31
4.1.6	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>H. influenzae</i>	32
4.1.7	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>E. coli</i>	34
4.1.8	Občutljivost bakterijskih izolatov rodu <i>Enterobacter</i>	35
4.1.9	Občutljivost bakterijskih izolatov rodu <i>Klebsiella</i>	36
4.1.10	Občutljivost bakterijskih izolatov rodu <i>Serratia</i>	37
4.1.11	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>A. baumannii</i>	38
4.1.12	Občutljivost bakterijskih izolatov vrste <i>P. aeruginosa</i>	39
4.2	METODA DIFUZIJSKEGA GRADIENTA	40
4.2.1	Občutljivost bakterijskih izolatov MRSA za tigeciklin	40
4.2.2	Občutljivost ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov <i>E. coli</i> za tigeciklin	41

4.2.3	Občutljivost ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov <i>K. pneumoniae</i> za tigeciklin	41
4.2.4	Občutljivost bakterijskih izolatov <i>S. maltophilia</i> za tigeciklin	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1	RAZPRAVA	44
5.1.1	Mikrodilucijska metoda	45
5.1.2	Metoda difuzijskega gradienta	52
5.2	SKLEPI	54
6	POVZETEK	55
7	VIRI	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Antibiotiki in njihove koncentracije, ki smo jih testirali pri po Gramu pozitivnih bakterijskih izolatih	18
Preglednica 2: Antibiotiki in njihove koncentracije, ki smo jih testirali pri po Gramu negativnih bakterijskih izolatih	19
Preglednica 3: Priporočene mejne vrednosti občutljivosti po Gramu pozitivnih kontrolnih sevov, postavljene s strani CLSI (CLSI, 2008)	22
Preglednica 4: Priporočene mejne vrednosti občutljivosti po Gramu negativnih kontrolnih sevov, postavljene s strani CLSI (CLSI, 2008)	23
Preglednica 5: Interpretacijski kriteriji za občutljivost nekaterih patogenih bakterijskih izolatov za antibiotik tigeciklin	23
Preglednica 6: Občutljivost 135 bakterijskih izolatov vrst <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , rodu <i>Enterococcus</i> in enterobakterij za antibiotik tigeciklin	25
Preglednica 7: Rezultati občutljivosti in MIK ₉₀ [μg/mL] za antibiotik tigeciklin pri izolatih posameznih rodov/vrst	26
Preglednica 8: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste <i>S. pneumoniae</i> za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, minociklin in tigeciklin	28
Preglednica 9: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu <i>Enterococcus</i> za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, meropenem, piperacilin s tazobaktamom, vankomicin, linezolid, minociklin in tigeciklin	29
Preglednica 10: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste <i>S. aureus</i> za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, vankomicin, linezolid, minociklin in tigeciklin	31
Preglednica 11: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste <i>S. agalactiae</i> za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, vankomicin, minociklin in tigeciklin	32
Preglednica 12: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste <i>H. influenzae</i> za antibiotike: ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, minociklin in tigeciklin	33

- Preglednica 13:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *E. coli* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin 34
- Preglednica 14:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Enterobacter* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin 35
- Preglednica 15:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Klebsiella* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin 36
- Preglednica 16:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Serratia* za antibiotike: ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin 37
- Preglednica 17:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *A. baumannii* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, minociklin in tigeciklin 38
- Preglednica 18:** Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *P. aeruginosa* za antibiotike: ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin 39
- Preglednica 19:** Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta bakterijskih izolatov MRSA za antibiotik tigeciklin 41
- Preglednica 20:** Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *E. coli* za antibiotik tigeciklin 41
- Preglednica 21:** Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *K. pneumoniae* za antibiotik tigeciklin 42
- Preglednica 22:** Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta bakterijskih izolatov *S. maltophilia* za antibiotik tigeciklin 43

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura tigeciklina (Towsend in sod., 2007)	14
Slika 2: Mehanizem delovanja tigeciklina (Tygacil, 2008)	14
Slika 3: Panel MicroScan (Dade Behring Inc.)	17
Slika 4: Razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan za testiranje po Gramu pozitivnih bakterij	18
Slika 5: Razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan za testiranje po Gramu negativnih bakterij	19
Slika 6: Rezultat mikrodilucijske metode v panelu MicroScan pri enterobakterijah	22
Slika 7: Rezultat metode difuzijskega gradienta za tigeciklin	24
Slika 8: Število po Gramu pozitivnih bakterijskih izolatov z določeno MIK tigeciklina	27
Slika 9: Število po Gramu negativnih bakterijskih izolatov z določeno MIK tigeciklina	27
Slika 10: MIK ₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste <i>S. pneumoniae</i>	28
Slika 11: MIK ₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksicilin s klavulansko kislino (AUG), meropenem (MER), piperacilin s tazobaktamom (P/T), vankomicin (VA), linezolid (LZD), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih rodu <i>Enterococcus</i>	30
Slika 12: MIK ₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), vankomicin (VA), linezolid (LZD), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste <i>S. aureus</i>	31

- Slika 13:** MIK₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), vankomicin (VA), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *S. agalactiae* 32
- Slika 14:** MIK₉₀ za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *H. influenzae* 33
- Slika 15:** MIK₉₀ za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *E. coli* 34
- Slika 16:** MIK₉₀ za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih rodu *Enterobacter* 35
- Slika 17:** MIK₉₀ za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih rodu *Klebsiella* 36
- Slika 18:** MIK₉₀ za ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih rodu *Serratia* 37
- Slika 19:** MIK₉₀ za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *A. baumannii* 38
- Slika 20:** Rezultat mikrodilucijske metode pri enem od izolatov vrste *P. aeruginosa* 39

Slika 21: MIK₉₀ za ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *P. aeruginosa* **40**

SEZNAM OKRAJŠAV

ATCC	ang. The American Type Culture Collection
CLSI	ang. Clinical and Laboratory Standards Institute
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ESBL	laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja
FDA	ang. Food and Drug Administration
KA	krvni agar
McF	McFarland
MH	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	penicilin vezoči protein
RNK	ribonukleinska kislina
SCC <i>mec</i>	ang. <i>staphylococcal</i> cassette chromosome <i>mec</i>
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki

1 UVOD

Eden izmed pomembnih mejnikov v razvoju in napredku medicine je odkritje antibiotikov, ki je močno prispevalo k zmanjšanju zapletov zdravljenja bakterijskih okužb in umrljivosti zaradi infekcijskih bolezni. V zadnjem času pa številne raziskave kažejo na povezanost uporabe antibiotikov s pojavom bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim antibiotikom (Tenover, 2001).

Do razvoja odpornih bakterijskih izolatov je prišlo že s samim odkritjem protibakterijskih sredstev, vendar je problem odpornosti po vsem svetu zelo narasel z odkritjem večkratno odpornih bakterij, ki povzročajo težave pri zdravljenju številnih okužb. Med njimi so najbolj znani proti meticilinu odporni izolati *Staphylococcus aureus* (MRSA iz ang. methicillin-resistant *S. aureus*), izolati enterobakterij, ki izločajo laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja (ESBL iz ang. extended spectrum betalactamases) in proti vankomicinu odporni izolati enterokokov (VRE iz ang. vancomycin-resistant enterococci) (MacDougall in Polk, 2005).

K širjenju proti antibiotikom odpornih bakterij prispevajo številni dejavniki okolja, ki ustvarjajo selekcijski pritisk. Tako široka, nepravilna in nekritična uporaba antibiotikov v bolnišnicah in zunaj njih poveča selekcijski pritisk in omogoči pojav odpornih bakterij v tem okolju. Posledično se po vsem svetu povečuje število bolnikov s težjimi oblikami bakterijskih okužb. Za omejitev širjenja okužb in učinkovito zmanjšanje bakterijske odpornosti je zelo pomembno hitro in zgodnje odkrivanje odpornih izolatov. Pomemben del boja proti bakterijski odpornosti pa predstavlja tudi smotrna uporaba antibiotikov (Madigan in sod., 2003).

Zaradi pojava bakterijske odpornosti proti dosedaj učinkovitim zdravilom postaja izbira antibiotikov za zdravljenje bakterijskih okužb vedno ožja. Zato je potreba po odkrivanju novih učinkovitih protimikrobnih sredstev zelo velika.

Eden zadnjih razvitih širokospektralnih antibiotikov je tigeciklin, ki spada v skupino glicilciklinov in je namenjen predvsem za zdravljenje zapletenih okužb kože in podkožja in zapletenih okužb v trebušni votlini (Zhanel in sod., 2004).

V Sloveniji je bil marca 2008 šele sprožen postopek za pridobitev dovoljenja za promet s tigeciklinom (Tygacil) in se ga zaenkrat še ne uporablja. Zaradi vseh svojih lastnosti bo verjetno zdravilo v prihodnosti pritegnilo veliko pozornosti strokovne javnosti.

1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kakšna je občutljivost najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb, osamljenih pri hospitaliziranih bolnikih v Sloveniji za novi glicilciklinski antibiotik tigeciklin pred začetkom uporabe v naši državi.

Na osnovi podatkov iz literature smo pričakovali, da bo novi glicilciklinski antibiotik tigeciklin dobro učinkovit proti enterokokom (vključno z VRE), izolatom *S. aureus* (vključno z MRSA) in proti enterobakterijam (vključno z izolati, ki izločajo ESBL). Pričakovali smo tudi dobro učinkovitost tigeciklina proti ostalim po Gramu pozitivnim bakterijam, medtem ko smo domnevali, da je njegova učinkovitost proti izolatom *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter* spp. slabša.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so kemijske snovi, ki s svojim delovanjem ovirajo razmnoževanje mikroorganizmov (baktericidni učinek) oziroma preprečujejo njihovo rast (bakteriostatični učinek). V osnovi so antibiotiki naravne substance in so produkt živih celic, v zadnjem času pa je večina izdelanih s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Slednje izboljša tako njihov protimikrobni učinek kot tudi farmakološke značilnosti (Madigan in sod., 2000).

Na uporabnost antibiotikov pomembno vplivajo njihove lastnosti. Med ugodne lastnosti antibiotikov spadajo širok spekter delovanja, dobro prodiranje v medceličnino oz. celice, peroralno jemanje antibiotika, malo stranskih učinkov itd. Te lastnosti povečajo njihovo uporabnost, lahko pa se prav zaradi širokega spektra delovanja in posledično pogostejše uporabe antibiotika razvije odpornost bakterij proti antibiotiku, kar pa ni ugodno za zdravljenje bakterijskih infekcij. Antibiotiki imajo lahko tudi takšne lastnosti, ki njihovo uporabnost zmanjšujejo (ozek spekter delovanja, počasno prodiranje do celic, ni možno peroralno jemanje, toksičnost ...). Za zdravljenje okužb bolnikov je zaželeno, da je na tržišču vedno več antibiotikov z ugodnim delovanjem (Anzueto in Adams, 2003).

Glede na mehanizem delovanja in kemično zgradbo razdelimo antibiotike v različne skupine. Prva skupina antibiotikov preprečuje sintezo celične stene, drugi vplivajo na sintezo znotrajceličnih beljakovin, tretja skupina antibiotikov vpliva na sintezo jedrnih nukleinskih kislin in zadnji zavirajo delovanje citoplazemske membrane (Jenkins in Valentine, 2003).

2.1.1 Zaviralci sinteze celične stene

Bakterijska celična stena je sestavljena iz peptidoglikana, kjer se N-acetil-muraminska kislina povezuje z N-acetil glukozaminom v verigo. Pomembno vlogo pri zamreženju imajo penicilin vezoči encimi (PBP iz ang. penicillin binding protein). V kolikor se

inhibitorji celične stene vežejo nanje, izgubijo funkcijo in pride do kopičenja osnovnih elementov celične stene in posledično do avtokatalitičnega uničenja celice.

Betalaktamski antibiotiki

V skupino betalaktamov spadajo penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami in zaviralci laktamaz beta. Njihova značilnost je betalaktamski obroč. Zavirajo sintezo celične stene, in sicer vstopajo skozi bakterijsko celično steno in se povežejo s proteini PBP, ki so kot receptorji na citoplazemski membrani. Z vezavo na proteine PBP preprečijo njihovo delovanje in tako je postopek transpeptidacije prekinjen. Po aktivaciji specifičnih encimov v celični steni bakterije pride do samouničenja celice.

Penicilini so najbolj razširjena skupina antibiotikov, ki se v klinični medicini široko uporabljajo. V to skupino spada tudi prvi odkrit antibiotik penicilin, ki ga je leta 1929 odkril Alexander Fleming in je produkt plesni *Penicillium notatum*, danes pa je večina penicilinov polysintetičnih oziroma sintetičnih derivatov (Rang in sod., 2001). Poleg naravnih penicilinov (penicilin G in penicilin V) in proti penicilazam odpornih penicilinov (meticilin, oksacilin) poznamo še skupine penicilinov s širokim spektrom delovanja, in sicer aminopeniciline (amoksicilin, ampicilin), karboksipeniciline (karbenicilin) ter ureidopeniciline (piperacilin). Pri zdravljenju se uporabljajo tudi kombinacije penicilinov in zaviralcev laktamaz beta, npr. amoksicilin s klavulansko kislino, ki pa pogosto povzročajo alergijske reakcije in dražijo centralni živčni sistem (Murray in sod., 2002).

Cefalosporini so polysintetični derivati 7-aminocefalosporanske kisline, izolirane iz plesni rodu *Cephalosporium*. Delujejo podobno kot penicilini in jih delimo v štiri generacije, ki se razlikujejo predvsem po antibakterijskem spektru delovanja in načinu dajanja antibiotika. Od prve do četrte generacije se je njihov spekter delovanja širil proti po Gramu negativnim bakterijam, povečevala se je aktivnost proti anaerobom in odpornim mikrobom, medtem ko se je zmanjševala učinkovitost proti po Gramu pozitivnim mikroorganizmom (Murray in sod., 2002).

Karbapenemi (imipenem, meropenem) so polysintetični antibiotiki, ki imajo najširši spekter delovanja med znanimi zaviralci sinteze celične stene (Brooks in sod., 2004).

Glikopeptidi

Glikopeptidni antibiotiki preprečujejo sintezo celične stene. V to skupino uvrščamo vankomicin in teikoplanin. Vankomicin je baktericidni antibiotik, ki ga pridobivajo iz bakterijske vrste *Streptomyces orientalis*. Teikoplanin je nov kompleksen glikopeptid. Delujeta tako, da spremenita pentapeptidne prekursorske molekule peptidoglikana s transglikozilacijo, ko prehajajo skozi citoplazemsko membrano, in preprečita vezavo peptidnih prekurzorjev na nastajajočo verigo peptidoglikana in nadaljno navzkrižno povezavo (transpeptidacijo). Učinkovita sta le proti po Gramu pozitivnim mikroorganizmom (Cetinkaya in sod., 2000).

2.1.2 Zaviralci sinteze znotrajceličnih proteinov

Tetraciklini

Tetraciklini so širokospektralni antibiotiki, ki so bili odkriti okrog leta 1940. Ker povzročajo razmeroma malo stranskih učinkov, jih pogosto uporabljamo pri zdravljenju okužb po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij ter atipičnih povzročiteljev infekcij (klamidije, mikoplazme, rikecije, protozoje). Z vezavo na ribosomsko podenoto 30S prepreči vezavo aminoacil-tRNK molekuli na akceptorsko mesto (A) ribosoma in tako preprečijo sintezo proteinov (Chopra in Roberts, 2001).

Makrolidi

Makrolidi so antibiotiki s širokim spektrom delovanja, ki so v manjših koncentracijah bakteriostatični, v večjih pa baktericidni. Eden izmed najbolj znanih makrolidov je eritromicin, ki s svojo vezavo na ribosomski podenoti 23S in 50S preprečuje translacijo proteinov. Novejši makrolidni antibiotik je azitromicin, ki dobro prodira v nevtrofilce in makrofage in ga uporabljajo za zdravljenje okužb, katerih povzročitelji so ujeti v fagocitnih celicah (Murray in sod., 2002).

Piranozidni antibiotiki - linkozamidi

Tako kot makrolidi tudi linkozamidi (klindamicin, linkomicin) zavirajo sintezo proteinov, saj se vežejo na ribosomsko podenoto 50S, natančneje s 23S rRNK molekulo in blokirajo

podaljševanje polipeptida. Z njimi zdravimo okužbe s po Gramu pozitivnimi bakterijami in anaerobi (Petinaki in sod., 2008).

2.1.3 Zaviralci sinteze nukleinskih kislin

Kinoloni

Kinoloni predstavljajo eno pomembnejših skupin sintetičnih antibiotikov z baktericidnim delovanjem. Ker zavirajo delovanje DNK-giraze, ki je potrebna pri DNK podvojevanju in replikaciji, preprečujejo oblikovanje bakterijskega kromosoma. Uporabljamo jih pri zdravljenju sistemskih okužb in okužb sečil s po Gramu negativnimi mikroorganizmi ter atipičnimi povzročitelji (klamidije, rikecije). Glede na spekter delovanja poznamo tri generacije, med katerimi je najbolj znan ciprofloksacin, ki spada med kinolone druge generacije (Murray in sod., 2002).

Sulfonamidi

Sulfonamidi so bakteriostatični antibiotiki, ki jih v kliničnem zdravljenju ne uporabljamo več pogosto zaradi vse večjega pojava odpornosti bakterij proti njim. Njihovo učinkovitost povečamo v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki, najpogosteje s trimetoprimom (sulfometoksazol in trimetoprim). Po kemični zgradbi so podobni paraaminobenzojevi kislini, ki tekmujejo za ista vezavna mesta na encimu dihidropteroat sintetazi. Posledično je preprečena sinteza tetrahidrofolne kisline in pirimidinov, osnovnih gradnikov nukleinskih kislin, in s tem je prekinjena sinteza DNK. Prokariotske celice same sintetizirajo tetrahidrofolno kislino, zato je vgraditev neučinkovitega ekvivalenta paraaminobenzojeve kisline zanje toksična. Za evkariotske celice pa sulfonamidi niso toksični, saj te same ne izdelujejo folne kisline in so odvisne od zunanjih, že pripravljenih virov (Brooks in sod., 2004).

Trimetoprim

Je učinkovit bakteriostatičen antibiotik, ki zavira delovanje encima dihidrofolne reduktaze in na ta način preprečuje sintezo tetrahidrofolne kisline. Trimetoprim je bolj toksičen za prokariotske kot za evkariotske celice, saj imajo encimi dihidrofolne kisline večjo afiniteto vezave za trimetoprim pri prokariotskih celicah. Uporabljamo ga

v kombinaciji s sulfometoksazolom pri zdravljenju okužb s po Gramu negativnimi mikrobi (Barrow in sod., 2007).

2.1.4 Zaviralci delovanja citoplazemske membrane

Zaviralci delovanja celične membrane selektivno zavirajo procese v citoplazemski membrani in tako ovirajo razmnoževanje prokariontskih celic. Zaradi različne strukture evkariontske in prokariontske citoplazemske membrane, zaviralci večinoma niso toksični za evkariontske celice.

Polimiksini

So ciklični baktericidni polipeptidni antibiotiki, ki delujejo podobno kot detergenti in razgrajujejo fosfolipidni dvosloj. Uporabljamo jih za zdravljenje okužb s po Gramu negativnimi mikrobi. Najbolj znana sta kolistin in polimiksin, katerega uporaba je omejena zaradi nefrotoksičnosti (Tsubery in sod., 2005).

2.2 PRIDOBITEV ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

Že od samega začetka uporabe antibiotikov za zdravljenje bakterijskih okužb poznamo tudi pojav bakterijske odpornosti proti antibiotikom, ki jim omogoča selektivno prednost v okolju. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno (intrinzično) odporni proti določenim antibiotikom zaradi značilnih fizioloških, strukturnih ali genetskih lastnosti. Pri mikroorganizmih, ki nimajo tarčnih mest, na katere delujejo antibiotiki, ali pri tistih z značilno sestavo celične stene je preprečen vdor antibiotikov do mesta njihovega delovanja.

Posamezni izolati neke bakterijske vrste ali rodu lahko odpornost proti antibiotikom tudi pridobijo in taka odpornost je nepredvidljiva. Pridobljena odpornost je lahko posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena ali pridobitve nove genetske lastnosti s horizontalnim genskim prenosom, najpogosteje s konjugacijo ali transformacijo. Geni z zapisom za odpornost se običajno nahajajo na plazmidih, integronih, transpozonih, lahko

pa pridobijo odpornost z rekombinacijo tuje DNK v kromosom ali z mutacijami v različnih kromosomskih lokusih (Martinez in Baquero, 2000).

Naraščanje pojavnosti odpornih bakterijskih izolatov je problem svetovne razsežnosti. Vzroki za nastanek so mnogoštevilni. Ne samo naraščanje števila odpornih bakterij, ki vstopajo v prehransko verigo, ampak je skrb vzbujajoče tudi dejstvo, da narašča rezistenca med bakterijami, ki povzročajo najpogostejše okužbe pri človeku v bolnišnicah in domačem okolju. Zaradi izboljšanja zdravstvenega statusa narašča število starostnikov in imunsko oslabljenih ljudi, prav tako nizkocenovni leti povečujejo pogostost potovanj po vsem svetu. K nevarnemu povečanju števila odpornih mikroorganizmov proti antibiotikom prispevajo tudi njihova nepravilna in nekritična uporaba, neupoštevanje odmerka in časa jemanja antibiotikov, slabo profesionalno poznavanje delovanja kemoterapevtikov in posledično njihova nepravilna uporaba, pa tudi pomanjkljivo spremljanje gibanja odpornosti med bakterijami (Madigan in sod., 2003).

Poznanih je pet osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom, in sicer: encimska razgradnja antibiotika, sprememba tarčnega mesta – prijemališča antibiotika, sprememba strukture celične membrane in posledično zmanjšana prepustnost za antibiotik, aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice in sprememba presnovne poti, na katero antibiotik deluje (Avison, 2005).

2.3 VEČKRATNO ODPORNE BAKTERIJE

2.3.1 Proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*

V bolnišničnem okolju lahko resna bolezenska stanja povzročijo proti meticilinu odporni izolati bakterije *S. aureus* – MRSA. Večina sevov MRSA pogosto okužijo kožo, mehka tkiva, kirurške in druge rane, povzročajo pa tudi sistemske okužbe, kot sta bakteriemija in sepsa. Odpornost pri MRSA zajema vse betalaktamske antibiotike in je povezana z vzporedno odpornostjo tudi proti drugim skupinam antibiotikov, vključno s cefalosporini in karbapenemi. Eden izmed pomembnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom je sprememba encimov PBP, ki so nujno potrebni pri sintezi

peptidoglikana. Širjenje MRSA v bolnišničnih okoljih po vsem svetu je olajšano s horizontalnim prenosom gena za meticilinsko rezistenco. To onemogoča učinkovito zdravljenje okužb s temi antibiotiki in oža izbor učinkovitih protimikrobnih sredstev (Enright in sod., 2002).

Življenjsko nevarne bolnišnične okužbe so povezane s katetri in drugimi umetnimi vsadki. Vzrok za odpornost *S. aureus* proti meticilinu je izdelovanje novega tipa penicilin vezočega proteina PBP2a, ki ga kodira kromosomski gen *mecA*. Je del velikega mobilnega genetskega elementa *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*). PBP2a je po svojem delovanju transpeptidaza, ki katalizira nastanek prečnih povezav v peptidoglikanskem delu celične stene. PBP2a ima nizko afiniteto vezave za betalaktame in je sposoben učinkovite sinteze celične stene tudi takrat, ko so vsi ostali proteini PBP zavrti. Izolati, razširjeni v bolnišničnem okolju, imajo enega izmed obstoječih zapisov za gensko kaseto *SCCmec* tip I, II ali III. Okužba z MRSA podaljša bivanje v bolnišnicah, poveča stroške zdravljenja in smrtnost bolnikov (Enright in sod., 2002).

Najprej so se sevi MRSA širili v bolnišničnem okolju, zadnja leta pa se vse pogosteje nahajajo tudi v domačem okolju, kjer se širi zapis za gensko kaseto *SCCmec* tip IV, ki resno ogroža majhne otroke in ljudi, ki živijo v tesnem stiku (Gupta in sod., 2007).

Zdravljenje okužb z MRSA je večinoma omejeno na glikopeptide, vankomicin in teikoplanin, čeprav se že pojavljajo bakterijski izolati, ki so odporni tudi proti vankomicinu (Tiwari in Sen, 2006).

2.3.2 Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja

Betalaktamski antibiotiki so med najpogosteje predpisanimi protimikrobnimi sredstvi, zato je pojav odpornosti proti njim močno omejil njihovo uporabo. Za zdravljenje okužb z bakterijskimi izolati, ki izdelujejo laktamaze beta in so odporni proti penicilinom in cefalosporinom prve generacije, uporabljajo encimsko relativno stabilne in širokospektralne cefalosporinske derivate. Encimi laktamaze beta razgradijo

betalaktamski obroč batalaktamskih antibiotikov. Poznamo številne raznolike encime, ki jih kodirajo plazmidni ali kromosomski geni in se med seboj razlikujejo po svojih substratih, fizikalnih in kemičnih lastnostih (Seme, 2002).

V zadnjih treh desetletjih so se med po Gramu negativnimi enterobakterijami pojavile proti slednji skupini antibiotikov odporne mutante, ki proizvajajo laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja – ESBL. Bakterije, ki izločajo ESBL, hidrolizirajo poleg penicilinov in cefalosporinov prve generacije tudi cefalosporine tretje in četrte generacije ter aztreonam, ne pa tudi karbapenemov, cefamicinov in zaviralcev laktamaz beta (Seme, 2002).

Geni za ESBL se nahajajo na mobilnih genetskih elementih, kar omogoča hitrejšo širjenje determinant odpornosti znotraj celotne družine *Enterobacteriaceae*. Do sedaj so identificirali preko 150 različnih tipov ESBL, od katerih vsak tip encima posreduje drugačen profil odpornosti. Na podlagi aminokislinskega zaporedja jih delimo na 9 strukturnih ali evolucijskih družin, od katerih sta najpomembnejši družini z encimi TEM in SHV, ki predstavljajo tudi največji delež ESBL (Bradford, 2001).

ESBL izdelujejo predvsem enterobakterije iz vrst *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae* ter bakterije iz vrst *Pseudomonas aeruginosa*. Bolniki z venskimi, arterijskimi ali urinarnimi katetri, bolniki, ki so že dlje časa v bolnišnični oskrbi, ter bolniki, ki prejemajo širokospektralne cefalosporine, so najbolj dovzetni za okužbo z bakterijskimi izolati, ki izločajo ESBL. Zdravljenje teh okužb predstavlja izziv, saj izražajo bakterije različne nivoje odpornosti proti različnim antibiotikom iz skupine širokospektralnih cefalosporinov. Zaenkrat se najbolj uporabljajo karbapenemi, cefotetan in piperacilin v kombinaciji s tazobaktamom (Paterson in Bonomo, 2005).

2.3.3 Enterokoki, odporni proti glikopeptidom

Leta 1988 so bili odkriti prvi proti vankomicinu odporni enterokoki – VRE. Zaradi izjemno hitrega širjenja in naravne odpornosti enterokokov proti večini danes

uporabljanih antibiotikov predstavljajo enega izmed glavnih problemov pri zdravljenju bolnišničnih okužb tako v Evropi kot ZDA. Za večino okužb pri človeku sta odgovorni dve vrsti, in sicer *Enterococcus faecalis* in *Enterococcus faecium*. So del normalne bakterijske flore prebavil ljudi in živali, v bolnišničnem okolju pa so pomembni patogeni povzročitelji okužb urinarnega trakta, endokarditisa, abdominalnih abscesov in tudi sepse (Seme, 2002).

Glikopeptidna antibiotika vankomicin in teikoplanin učinkujeta le proti po Gramu pozitivnim mikrobom. Oblikujeta kompleks s C-terminalnim koncem prekurzorja peptidoglikana in s tem preprečita njegovo vključitev v celično steno. Pri prehajanju pentapeptidnih prekurzorskih molekul skozi citoplazemsko membrano jih spremenita in tako preprečita nastanek verige peptidoglikana in njegovo prečno povezovanje oziroma transpeptidacijo (Arthur in sod., 1996).

V klinični mikrobiologiji so znani trije fenotipi odpornosti enterokokov proti vankomicinu: VanA, VanB in VanC. Enterokoki s fenotipom VanA so visoko odporni tako proti vankomicinu kot tudi teikoplaninu. Zapisi za proteine, odgovorne za razvoj odpornosti proti glikopeptidom, se nahajajo na mobilnem transpozonu Tn1546, ki se lahko vključi v plazmid in se s konjugacijo prenaša v druge seve enterokokov in tako pride do širjenja VRE. Enterokoki fenotipa VanB so odporni proti vankomicinu, vendar občutljivi za teikoplanin. Za fenotip VanC pa je značilna nizka stopnja odpornosti proti vankomicinu in je značilna za vrste *Enterococcus casseliflavus* ter *Enterococcus gallinarum*. Vzrok za hitro širjenje VRE je sposobnost konjugacije in transpozicije, kjer pride do prenosa transpozona Tn1546 ali plazmida z vključenim transpozonom, ki nosi gene za razvoj odpornosti (Seme, 2002).

Zdravljenje okužb z VRE je razmeroma uspešno. Inficirano tkivo iz rane kirurško odstranimo, bakteriemijo lahko zdravimo brez uporabe protimikrobnih sredstev, abscese spiramo. Okužbe urinarnega trakta zdravimo s fosfomicinom ali nitrofurantoinom, za resnejše okužbe pa uporabimo linezolid kot izbirni bakteriostatični antibiotik (Kauffman, 2003).

2.4 RAZVOJ NOVIH ANTIBIOTIKOV

Širjenje odpornosti proti antibiotikom je predvsem posledica široke in neustrezne uporabe antibiotikov. V praksi se to kaže z vse pogostejšimi neuspehi protimikrobnega zdravljenja in tako se je potrebno soočiti z novimi kliničnimi in ekonomičnimi izzivi za zdravljenje okužb z odpornimi sevi in izdelavo čim boljših laboratorijskih testov za diagnostiko ter v določenih primerih z zdravljenjem z dražjimi antibiotiki (Tenover, 2001).

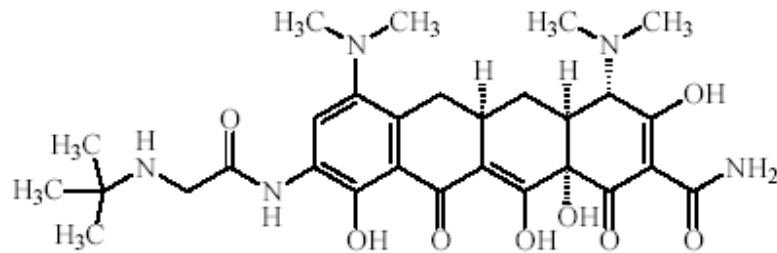
Zaradi pojava vse večjega števila večkratno odpornih bakterij prihaja do zapletov pri zdravljenju resnih okužb, zato je potreba po razvoju učinkovitih novih antibiotikov s širokim spektrom delovanja zelo velika.

Oksazolidinoni so nova skupina širokospektralnih antibiotikov, ki preprečujejo začetno stopnjo sinteze proteinov. Pomemben predstavnik je oksazolidinon linezolid, ki učinkuje pri po Gramu pozitivnih patogenih mikroorganizmih, vključno pri MRSA, VRE in proti penicilinu odpornim izolatom *Streptococcus pneumoniae* in anaerobnih bakterijah (Gill in sod., 2007).

V zadnjem času za zdravljenje okužb z MRSA in VRE uporabljajo še ciklični lipopeptid kvinupristin-dalfopristin, ki ima podoben spekter delovanja kot vankomicin, vendar že poročajo o pojavu nekaterih odpornih izolatov (Baddour in sod., 2006).

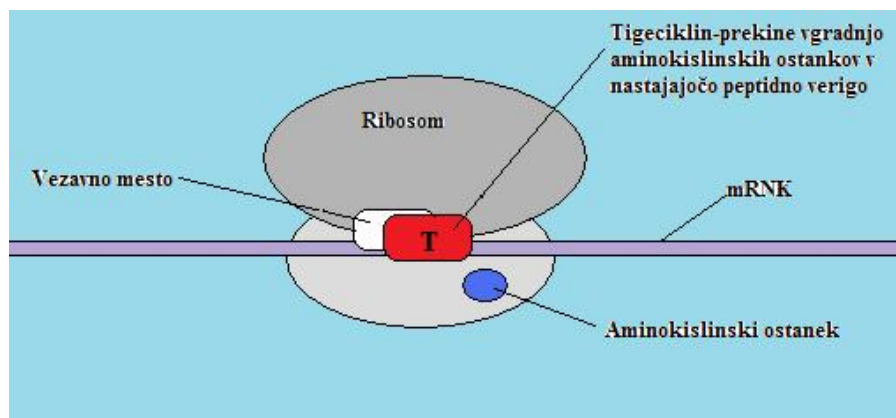
2.4.1 Tigeciklin

Tigeciklin je prvi antibiotik, ki spada v novo skupino protimikrobnih sredstev glicilciklinov, ki so po načinu delovanja podobni tetraciklinom. Je širokospektralni antibiotik z bakteriostatičnim učinkom in preprečuje sintezo bakterijskih proteinov. Po kemijski strukturi je 9-*tert*-butil-glicilamido sintetični derivat minociklina (slika 1) in je učinkovit tudi pri bakterijah, ki so odporne proti tetraciklinom (Frampton in Curran, 2005).



Slika 1: Kemijska struktura tigeciklina (Townsend in sod., 2007)

Tigeciklin se veže s 16S rRNK molekulo na 30S podenoti ribosoma in ima 5-krat večjo afiniteto vezave kot tetraciklini. To prepreči vstop amino-acilnih tRNK molekul do vstopnega mesta A na ribosomu in prekine vgradnjo aminokislinskih ostankov v nastajajoče peptidne verige (slika 2). Učinek zaviranja sinteze proteinov je 20-krat večji kot pri tetraciklinih. V celico vstopa preko bakterijske celične membrane s pasivno difuzijo ali z aktivnim transportom, za kar je potrebna energija (Reinert in sod., 2007; Zhanel in sod., 2004).



Slika 2: Mehanizem delovanja tigeciklina (Tygacil, 2008)

Tigeciklin je bil registriran leta 2005 v ZDA. Zanj je občutljivih večina po Gramu pozitivnih aerobnih bakterij in po Gramu negativnih enterobakterij ter nefermentativnih organizmov kot tudi večkratno odporne bakterije: MRSA, ESBL in VRE. Učinkovit je tudi proti večini po Gramu pozitivnim in negativnim anaerobom in atipičnim organizmom (Reinert in sod., 2007).

Namenjen je predvsem za zdravljenje zapletenih okužb kože in podkožja ter zapletenih okužb v trebušni votlini, in sicer z intravenoznim odmerjanjem. Tako kot pri večini antibiotikov se tudi pri zdravljenju s tigeciklinom pojavljajo neželeni učinki, ki pa se ne pojavijo pri vseh bolnikih. Najpogostejši stranski učinki, o katerih so poročali pri vsaj 1 od 10 bolnikov, ki so prejeli tigeciklin, so: slabost, bruhanje in driska. Med pogostimi so tudi abscesi, omotica, laboratorijsko določena zmanjšana sposobnost strjevanja krvi, bolečine v trebuhu, izpuščaji, glavobol, občasno pa lahko pride tudi do alergijske reakcije in znižane koncentracije krvnih ploščic. Študije so pokazale, da jemanje tigeciklina lahko upočasni rast kosti in povzroči trajno obarvanje zob, zato ga ne priporočajo nosečnicam in otrokom do 8. leta starosti (Greer, 2006).

Razpolovni čas tigeciklina je 36 ur in je daljši kot pri tetraciklinu in minociklinu. Primarna pot izločanja nespremenjenega tigeciklina iz telesa je z žolčem in urinom. Glukuronidacija in izločanje nespremenjenega tigeciklina skozi ledvice sta manj pomembni poti sproščanja iz telesa (Zhanel in sod., 2004). Starost in spol bolnika naj ne bi imela pomembnega vpliva na absorpcijo, sproščanje, porazdeljevanje med tkivi in izločanje tigeciklina pri posamezniku (Muralidharan in sod., 2005).

Uporaba tigeciklina lahko vpliva na normalno ustno in črevesno bakterijsko floro. V nekaterih primerih lahko povzroči razraščanje neobčutljivih organizmov, med katerimi so najpogostejše glivice in enterobakterije v črevesni mikroflori. Lahko pride tudi do kolonizacije potencialno patogenih mikroorganizmov oziroma do pojava odpornih bakterijskih vrst (Nord in sod., 2006).

Zaradi široke uporabe tetraciklinov za zdravljenje okužb tako pri ljudeh kot živalih so se pojavili številni odporni mikroorganizmi, kar je omejilo uporabo tetraciklinov za zdravljenje. Znani so trije mehanizmi odpornosti proti tetraciklinom: iznos tetraciklinov iz bakterijske celice, konformacijska sprememba ribosoma in ribosomska zaščita. Za pojav odpornosti so odgovorni geni, ki se nahajajo na mobilnih elementih: plazmidih, konjugativnih transpozonih in integronih in omogočajo prenos *tet* genov od vrste/rodu do druge vrste/rodu. *Tet* geni nosijo zapis za različne proteine, ki se nahajajo v bakterijski citoplazemski membrani in omogočajo iznos tetraciklinov iz celice. Poleg teh proteinov

kodirajo *tet* geni tudi druge proteine, ki sodelujejo pri konformacijski spremembi ribosoma, kar posledično povzroči disociacijo tetraciklinov z ribosoma ali celo prepreči njihovo vezavo na ribosom (Zhanel in sod., 2004).

Ti mehanizmi odpornosti pa ne učinkujejo proti glicilciklinom oziroma tigeciklinu. Zaradi kemične zgradbe na tigeciklin ne delujejo Tet črpalke, ki črpajo tetracikline iz bakterijske celice. Te predstavljajo najpomembnejši mehanizem odpornosti enterobakterij, bakterij iz rodu *Acinetobacter* in deloma stafilokokov proti tetraciklinom. Tudi na ribosome, ki imajo spremenjeno Tet beljakovino, ki omogoča odpornost predvsem po Gramu pozitivnim kokom proti tetraciklinom, se tigeciklin neovirano veže. Podobno kot tetraciklini pa je tudi tigeciklin občutljiv za kromosomske črpalke, ki predstavljajo mehanizem odpornosti proti več antibiotikom in so značilne za vrsto *Pseudomonas aeruginosa* in rod *Proteae* (Zhanel in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BAKTERIJSKI IZOLATI

V raziskavo smo vključili 267 bakterijskih izolatov. 200 izolatov je bilo osamljenih pri bolnikih, hospitaliziranih v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana v obdobju 6 mesecev (avgust 2007 – februar 2008), 67 bakterijskih izolatov pa smo izbrali iz zbirke izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Med po Gramu pozitivnimi bakterijami smo v raziskavo vključili izolate rodov in vrst: *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* ter *Streptococcus agalactiae*, med po Gramu negativnimi bakterijami pa izolate rodov in vrst: *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., *Klebsiella* spp. in *Stenotrophomonas maltophilia*.

Bakterijski izolati so bili osamljeni iz različnih kužnin, in sicer iz: krvi, sputuma, aspirata traheje, urina (ne več kot 25 % vseh izolatov), urinskega katetra, brisa rane in abscesa, punktata abscesa, drena in podobno. Pri posameznem bolniku smo uporabili le enega od izolatov, tako da ni prihajalo do ponavljanja. Vsi izolati so bili do testiranja shranjeni pri – 80° C.

3.2 TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJSKIH IZOLATOV

Občutljivost 200 izbranih izolatov najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb smo ugotavljali z mikrodilucijsko metodo in na ta način določili minimalne inhibitorne koncentracije različnih antibiotikov. Za testiranje smo uporabljali panele MicroScan (Dade Behring Inc., Sacramento, USA) (slika 3).



Slika 3: Panel MicroScan (Dade Behring Inc.)

Antibiotiki in razpon njihovih koncentracij, ki smo jih testirali pri po Gramu pozitivnih bakterijah, so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Antibiotiki in njihove koncentracije, ki smo jih testirali pri po Gramu pozitivnih bakterijskih izolatih

Antibiotik	Razpon testiranih koncentracij [mg/L]
amoksicilin s klavulansko kislino	0,03-8
piperacilin s tazobaktamom	0,25-16
levofloksacin	0,06-32
ceftriakson	0,03-64
linezolid	0,5-8
minociklin	0,25-8
vankomicin	0,12-32
ampicilin	0,06-16
penicilin	0,06-8
tigecklin	0,008-16
meropenem	0,12-16

Slika 4 prikazuje razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan (Dade Behring Inc.), ki smo ga uporabljali za testiranje po Gramu pozitivnih bakterij.

G	Aug 0,03	Aug 0,06	Aug 0,12	Aug 0,25	Aug 0,5	Aug 1	Aug 2	Aug 4	Aug 8	P/T 0,25	P/T 0,5
P/T 1	P/T 2	P/T 4	P/T 8	P/T 16	Lvx 0,06	Lvx 0,12	Lvx 0,25	Lvx 0,5	Lvx 1	Lvx 2	Lvx 4
Lvx 8	Lvx 16	Lvx 32	Cax 0,03	Cax 0,06	Cax 0,12	Cax 0,25	Cax 0,5	Cax 1	Cax 2	Cax 4	Cax 8
Cax 16	Cax 32	Cax 64	Lzd 0,5	Lzd 1	Lzd 2	Lzd 4	Lzd 8	Min 0,25	Min 0,5	Min 1	Min 2
Min 4	Min 8	Va 0,12	Va 0,25	Va 0,5	Va 1	Va 2	Va 4	Va 8	Va 16	Va 32	Am 0,06
Am 0,12	Am 0,25	Am 0,5	Am 1	Am 2	Am 4	Am 8	Am 16	P 0,06	P 0,12	P 0,25	P 0,5
P 1	P 2	P 4	P 8	Tgc 0,008	Tgc 0,015	Tgc 0,03	Tgc 0,06	Tgc 0,12	Tgc 0,25	Tgc 0,5	Tgc 1
Tgc 2	Tgc 4	Tgc 8	Tgc 16	Mer 0,12	Mer 0,25	Mer 0,5	Mer 1	Mer 2	Mer 4	Mer 8	Mer 16

Slika 4: Razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan (Dade Behring Inc.) za testiranje po Gramu pozitivnih bakterij

Legenda: Aug – amoksicilin s klavulansko kislino, P/T – piperacilin s tazobaktamom, Lvx – levofloksacin, Cax – ceftriakson, Lzd – linezolid, Min – minociklin, Va – vankomicin, Am – ampicilin, P – penicilin, Tgc – tigecklin, Mer – meropenem.

Antibiotiki in razpon njihovih koncentracij, ki smo jih testirali pri po Gramu negativnih bakterijah, so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Antibiotiki in njihove koncentracije, ki smo jih testirali pri po Gramu negativnih bakterijskih izolatih

Antibiotik	Razpon testiranih koncentracij [mg/L]
amoksicilin s klavulansko kislino	0,12-32
piperacilin s tazobaktamom	0,06-128
levofloksacin	0,008-8
ceftriakson	0,06-64
cefepim	0,5-32
ampicilin	0,5-32
amikacin	0,5-64
minociklin	0,5-16
ceftazidim	8-32
tigeciklin	0,008-16
meropenem	0,06-16

Slika 5 prikazuje razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan (Dade Behring Inc.), ki smo ga uporabljali za testiranje po Gramu negativnih bakterij.

G	Aug 0,12	Aug 0,25	Aug 0,5	Aug 1	Aug 2	Aug 4	Aug 8	Aug 16	Aug 32	P/T 0,06	P/T 0,12
P/T 0,25	P/T 0,5	P/T 1	P/T 2	P/T 4	P/T 8	P/T 16	P/T 32	P/T 64	P/T 128	Lvx 0,008	Lvx 0,015
Lvx 0,03	Lvx 0,06	Lvx 0,12	Lvx 0,25	Lvx 0,5	Lvx 1	Lvx 2	Lvx 4	Lvx 8	Cax 0,06	Cax 0,12	Cax 0,25
Cax 0,5	Cax 1	Cax 2	Cax 4	Cax 8	Cax 16	Cax 32	Cax 64	Cpe 0,5	Cpe 1	Cpe 2	Cpe 4
Cpe 8	Cpe 16	Cpe 32	Am 0,5	Am 1	Am 2	Am 4	Am 8	Am 16	Am 32	Ak 0,5	Ak 1
Ak 2	Ak 4	Ak 8	Ak 16	Ak 32	Ak 64	Min 0,5	Min 1	Min 2	Min 4	Min 8	Min 16
Caz 8	Caz 16	Caz 32	Tgc 0,008	Tgc 0,015	Tgc 0,03	Tgc 0,06	Tgc 0,12	Tgc 0,25	Tgc 0,5	Tgc 1	Tgc 2
Tgc 4	Tgc 8	Tgc 16	Mer 0,06	Mer 0,12	Mer 0,25	Mer 0,5	Mer 1	Mer 2	Mer 4	Mer 8	Mer 16

Slika 5: Razporeditev antibiotikov v panelu MicroScan (Dade Behring Inc.) za testiranje po Gramu negativnih bakterij

Legenda: Aug – amoksicilin s klavulansko kislino, P/T – piperacilin s tazobaktamom, Lvx – levofloksacin, Cax – ceftriakson, Cpe – cefepim, Am – ampicilin, Ak – amikacin, Min – minociklin, Caz – ceftazidim, Tgc – tigeciklin, Mer – meropenem.

3.3 METODE

3.3.1 Priprava uporabljenih gojišč

3.3.1.1 Krvni agar (KA)

Za pripravo gojišča KA smo na 1 L čiste vode dodali 40 g pripravljene mešanice BBL™ Infusion Agar (Blood Agar Base) (BD, Sparks, ZDA). Mešanica vsebuje:

2,0 g srčno-mišičnega ekstrakta,
13,0 g pankreazno razgrajenega kazeina,
5,0 g kvasnega ekstrakta,
5,0 g NaCl in
15,0 g agarja.

Nastalo zmes smo avtoklavirali in nato dodali 5 % sterilno z natrijevim citratom citrirano govejo kri.

3.3.1.2 Mueller-Hinton agar (MH)

Za pripravo gojišča MH smo na 1 L čiste vode dodali 38 g pripravljene mešanice BBL™ Brain Heart Infusion Agar (BD, Sparks, ZDA), ki vsebuje:

2,0 g govejega ekstrakta,
17,5 g kislega hidrolizata kazeina,
1,5 g škroba in
17,0 g agarja.

3.3.2 Priprava bakterijskih izolatov in bakterijske suspenzije

Zamrznjene izolate smo najprej odmrznili in jih nacepili na osnovno gojišče krvni agar (KA). Po 24-urni inkubaciji v pri $35 \pm 1^\circ \text{C}$, smo jih precepili na KA in nato ponovno inkubirali za 24 ur pri $35 \pm 1^\circ \text{C}$. V 3 mL Inoculum Water (Dade Behring Inc.) smo iz

čiste kulture izolata pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarland (McF). 100 µL bakterijske suspenzije smo prenesli v epruveto s 25 mL ustreznega bujona. Za izolate *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Serratia* spp. in *Klebsiella* spp. smo uporabljali Mueller-Hinton bujon (Dade Behring Inc.). Za izolate *S. pneumoniae* in *S. agalactiae* smo uporabljali Mueller-Hinton bujon s 3 % lizirano konjsko krvjo (Dade Behring Inc.) in za izolate *H. influenzae* Haemophilus Test Medium – HTM (Dade Behring Inc.). Vsebinsko v epruveti smo nato 8 do 10-krat premešali z obračanjem epruvete.

3.3.3 Inokulacija in rehidracija panelov

V vsako vdolbinico ustreznega panela (Gram-positive Panel – B1020-80W "Test Panel Pos" ali Gram-negative Panel – B1020-79W "Test Panel Neg") smo z osemkanalno pipeto (BIOHIT, Helsinki, Finland) prenesli po 100 µL bakterijske suspenzije v ustreznem bujonu. Panele smo inkubirali pri 35 ± 1 °C. Po 20-24 urni inkubaciji (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae* in *H. influenzae*) oz. 16-20 urni inkubaciji (preostali izolati) smo preverjali rast bakterijskih izolatov s pojavom motnosti in rezultate odčitali s pomočjo posebnega povečevalnega ogledala. Bakterijska rast se kaže kot zamotnitev vsebine vdolbinic oziroma kot gumbu podobna oblika posedenih bakterijskih celic na dnu vdolbinic (slika 6). MIK antibiotika za posamezen izolat je najnižja koncentracija antibiotika, ki popolnoma inhibira vidno rast bakterijskega izolata. Če je bila bakterijska rast opazna pri vseh testiranih koncentracijah antibiotika, je bil MIK izbranega antibiotika višji od najvišje testirane koncentracije, če rasti ni bilo pri nobeni koncentraciji antibiotika, je bil MIK antibiotika nižji/enak najnižji koncentraciji antibiotika. Veljavnost rezultatov testa z mikrodilucijsko metodo smo preverili s pozitivno kontrolo. V prvo vdolbinico vsakega panela, kjer ni bilo antibiotika, smo dodali bakterijski izolat in rast je morala biti prisotna.



Slika 6: Rezultat mikrodilucijske metode v panelu MicroScan (Dade Behring Inc.) pri enterobakterijah

Pri vsakem testiranju smo izvedli tudi kontrolo panelov s pomočjo standardnih kontrolnih sevov. Kontrolni sevi za Gram pozitivne bakterije so bili *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 in *S. pneumoniae* ATCC 49619, za Gram negativne bakterije pa *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247 ter *H. influenzae* ATCC 49766. Testiranje kontrolnih sevov smo izvedli po enakem postopku kot izolate. Če so rezultati občutljivosti kontrolnih sevov ustrezali priporočenim mejnim vrednostim, postavljenim s strani CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (preglednici 3 in 4), potem so bili uporabljeni paneli primerni za uporabo.

Preglednica 3: Priporočene mejne vrednosti občutljivosti po Gramu pozitivnih kontrolnih sevov, postavljene s strani CLSI (CLSI, 2008)

Kontrolni sev/Antibiotik	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 [mg/L]	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 [mg/L]	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 [mg/L]
amoksicilin s klavulansko kislino	0,12-0,5	0,25-1	≤ 0,03-0,12
piperacilin s tazobaktamom	≤ 0,25-2	1-4	N/A
levofloksacin	≤ 0,06-0,5	0,25-2	0,5-2
ceftriakson	1-8	N/A	≤ 0,03-0,12
Linezolid	1-4	1-4	≤ 0,5-2
minociklin	≤ 0,25-0,5	1-4	N/A
vankomicin	0,5-2	1-4	≤ 0,12-0,5
ampicilin	0,5-2	0,5-2	≤ 0,06-0,25
penicilin	0,25-2	1-4	0,25-1
tigeciklin	0,03-0,25	0,03-0,12	0,015-0,12
meropenem	≤ 0,12	2-8	≤ 0,12

Legenda: N/A – ni podatka

Preglednica 4: Priporočene mejne vrednosti občutljivosti po Gramu negativnih kontrolnih sevov, postavljene s strani CLSI (CLSI, 2008)

Kontrolni sev/Antibiotik	<i>E.coli</i> ATCC 25922 [mg/L]	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 [mg/L]	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247 [mg/L]	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 [mg/L]
amoksisilin s klavulansko kislino	2-8	N/A	2-16	N/A
piperacilin s tazobaktamom	1-4	1-8	≤ 0,06-0,5	N/A
levofloksacin	≤ 0,008-0,06	0,5-4	≤ 0,008-0,03	N/A
ceftriakson	≤ 0,06-0,12	8-64	≤ 0,06-0,25	N/A
cefepim	N/A	1-8	≤ 0,5-2	N/A
ampicilin	2-8	N/A	2-8	N/A
amikacin	≤ 0,5-4	1-4	N/A	N/A
minociklin	≤ 0,5-1	N/A	N/A	N/A
ceftazidim	N/A	N/A	N/A	N/A
tigeciklin	0.03-0,25	N/A	0,06-0,5	N/A
meropenem	≤ 0,06	0,25-1	N/A	≤ 0,06-0,12

Legenda: N/A – ni podatka

Pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijskih izolatih smo testirali enake koncentracije tigeciklina, in sicer 0'008, 0'015, 0'03, 0'12, 0'25, 0'5, 1, 2, 4, 8 in 16 (v mg/L). Ker za tigeciklin še ni CLSI interpretacijskih kriterijev, smo si pri interpretaciji rezultatov pomagali s kriteriji, ki jih je oblikovala ameriška organizacija FDA (Food and Drug Administration) in so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Interpretacijski kriteriji za občutljivost nekaterih patogenih bakterijskih izolatov za antibiotik tigeciklin

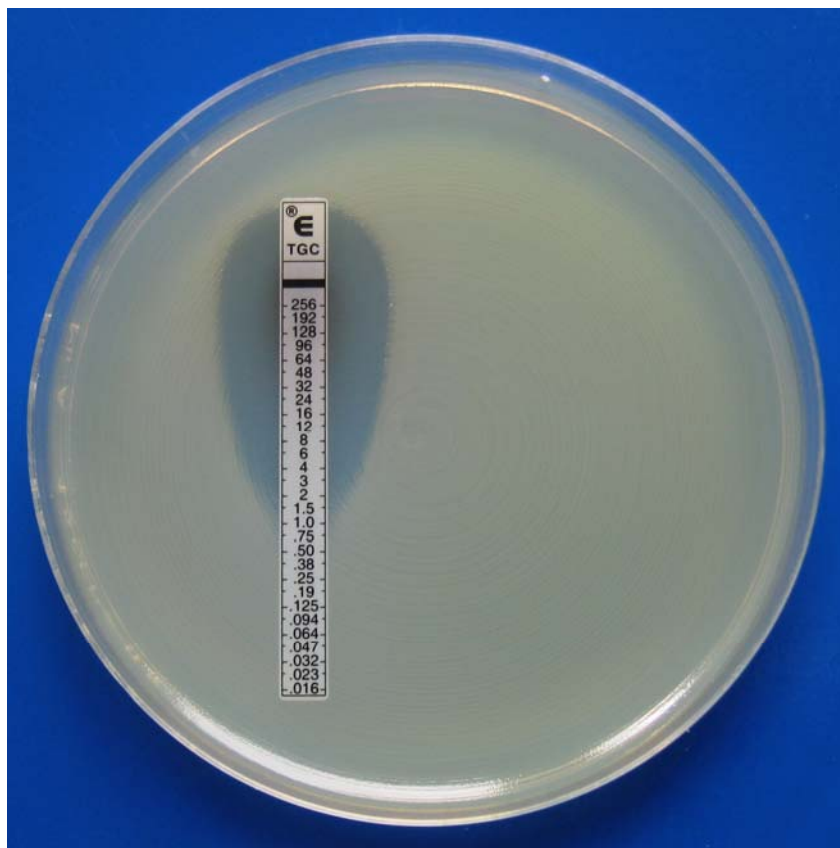
Patogen	MIK [µg/mL]		
	S	I	R
<i>S. aureus</i> (MSSA in MRSA)	≤ 0,5	/	/
<i>Streptococcus spp.</i> (ne velja za <i>S. pneumoniae</i>)	≤ 0,25	/	/
<i>E. faecalis</i> (ne velja za VRE)	≤ 0,25	/	/
enterobakterije	≤ 2	2-4	> 8

3.3.4 Metoda difuzijskega gradienta

Pri 67 večkratno odpornih bakterijskih izolatih, izbranih iz zbirke bakterijskih izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, smo MIK

tigeciklina določili s pomočjo metode difuzijskega gradienta ali s tako imenovano uporabo E-testov (AB BIODISK, Solna, Švedska). Na ta način smo testirali 3 izolate MRSA, 2 izolata *E. coli* – ESBL pozitivna, 37 izolatov *K. pneumoniae* – ESBL pozitivni in 25 izolatov *S. maltophilia*.

Po 24 urni inkubaciji pri 35 ± 1 °C smo iz čistih kultur na KA pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McF v 0,85 % fiziološki raztopini (bioMerieux, Marcy l'Étoile, Francija). Tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo s sterilnim vatiranim brisom konfluentno nanесли na MH agar. Nato smo nanj položili s tigeciklinom impregnirano membrano E-testa v koncentraciji od 0,016 µg/mL do 256 µg/mL. Gojišča smo inkubirali 24 ur pri 35 ± 1 °C in nato odčitali rezultate. MIK tigeciklina za izbrane bakterijske izolate smo odčitali na mestu popolne inhibicije rasti (stičišče, kjer se kraka inhibicijske elipse dotikata membrane z antibiotikom) (slika 7). Dobljene rezultate smo interpretirali na osnovi kriterijev, ki jih je oblikovala organizacija FDA (preglednica 5).



Slika 7: Rezultat metode difuzijskega gradienta za tigeciklin

4 REZULTATI

4.1 MIKRODILUCIJSKA METODA

V raziskavo smo vključili 200 bakterijskih izolatov, ki smo jih testirali z mikrodilucijsko metodo. Vsi izolati so bili vrstno opredeljeni. 65 jih je pripadalo po Gramu pozitivnim bakterijam, in sicer 15 vrsti *S. pneumoniae*, 15 rodu *Enterococcus*, 25 vrsti *S. aureus*, 10 vrsti *S. agalactiae*. Preostalih 135 bakterijskih izolatov je spadalo med po Gramu negativne bakterije, in sicer jih je 15 pripadalo vrsti *H. influenzae*, 15 rodu *Acinetobacter*, 25 vrsti *E. coli*, 25 rodu *Enterobacter*, 20 vrsti *P. aeruginosa*, 10 rodu *Serratia* in 25 rodu *Klebsiella*.

Z mikrodilucijsko metodo smo ugotavljali občutljivost vseh izolatov in določili MIK različnih antibiotikov. Še posebno so nas zanimala MIK novega glicilciklinskega antibiotika tigeciklina, ki je tik pred začetkom uporabe v naši državi.

4.1.1 Občutljivost bakterijskih izolatov za tigeciklin

Izolate iz vrst *S. aureus*, *S. agalactiae*, rodu *Enterococcus* (ne VRE) in enterobakterij smo na podlagi interpretacijskih kriterijev, ki jih je oblikovala ameriška organizacija FDA (preglednica 5), opredelili kot občutljive (S), mejno občutljive – intermediarne (I) ali odporne (R) (preglednica 6). Za vrste *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* in rod *Enterococcus* – VRE pa zaenkrat ni oblikovanih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin, zato smo zanje določili MIK₉₀, ki je najnižja koncentracija posameznega antibiotika, ki inhibira rast 90 % izolatov posamezne vrste.

Preglednica 6: Občutljivost 135 bakterijskih izolatov vrst *S. aureus*, *S. agalactiae*, rodu *Enterococcus* in enterobakterij za antibiotik tigeciklin

Tigeciklin	Število izolatov	%
S	134	99,3
I	1	0,7
R	0	0
Skupaj	135	100

Legenda: S – občutljiv, I – mejno občutljiv, R – odporen

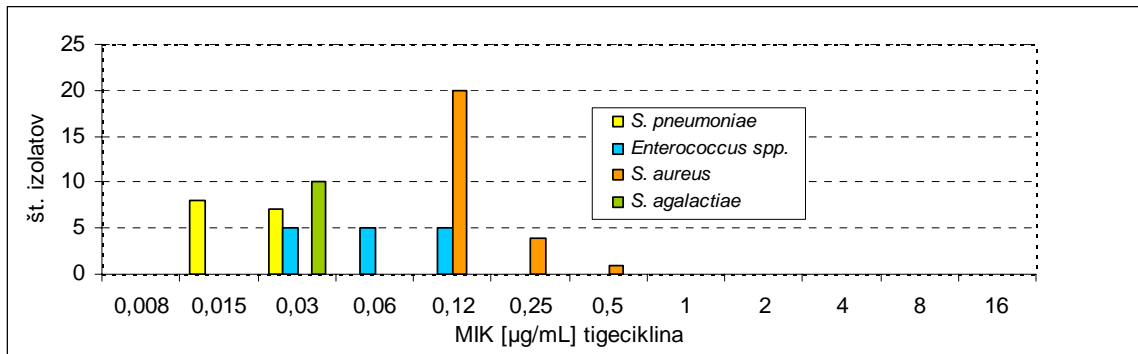
V preglednici 7 so prikazani rezultati občutljivosti in MIK_{90} (v $\mu\text{g/mL}$) za antibiotik tigecklin pri vseh 200 testiranih bakterijskih izolatih različnih rodov ali vrst. Velika večina (99,3 %) izolatov, za katere so oblikovani kriteriji za opredeljevanje občutljivosti, je bilo občutljivih za tigecklin. Tudi vrednosti MIK_{90} so bile nizke. Med vsemi testiranimi so izstopali le izolati vrste *P. aeruginosa*, za katere je bil MIK_{90} , v primerjavi z ostalimi izolati, zelo visok (16 $\mu\text{g/mL}$).

Preglednica 7: Rezultati občutljivosti in MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$] za antibiotik tigecklin pri izolatih posameznih rodov/vrst

Izolat	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število izolatov		
		S	I	R
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,03	N/A	N/A	N/A
<i>Enterococcus spp.</i>	0,12	15	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25	25	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,03	10	0	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,5	N/A	N/A	N/A
<i>Acinetobacter spp.</i>	1	N/A	N/A	N/A
<i>Escherichia coli</i>	0,5	25	0	0
<i>Enterobacter spp.</i>	1	25	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	N/A	N/A	N/A
<i>Serratia spp.</i>	2	10	0	0
<i>Klebsiella spp.</i>	2	24	1	0
Skupaj	/	134	1	0

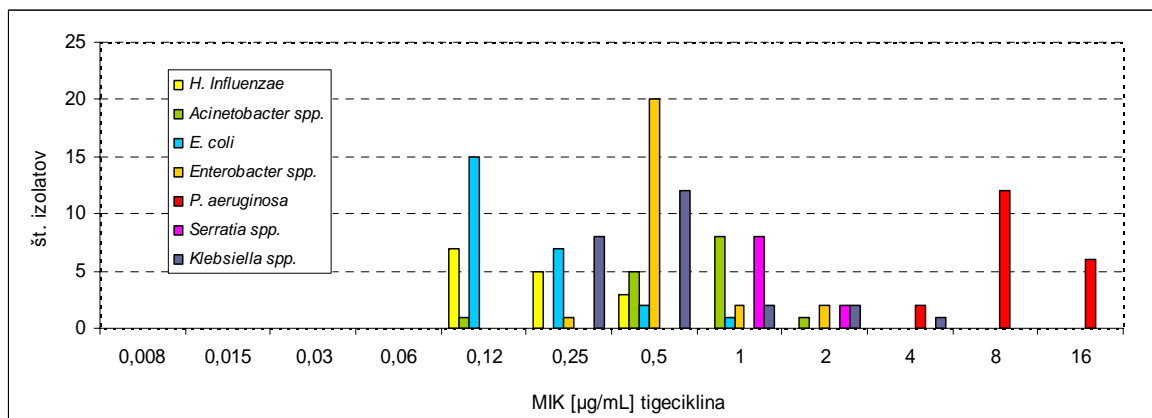
Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za tigecklin, S – občutljiv, I – mejno občutljiv, R – odporen

MIK tigecklina po Gramu pozitivnih bakterijskih izolatov so bile v razponu od 0,015 $\mu\text{g/mL}$ do 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Iz slike 8 je razvidno, da je bil najvišji MIK_{90} tigecklina med po Gramu pozitivnimi izolati pri vrsti *S. aureus* (0,25 $\mu\text{g/mL}$), najnižjo vrednost MIK_{90} tigecklina pa je imela vrsta *S. pneumoniae* (0,03 $\mu\text{g/mL}$).



Slika 8: Število po Gramu pozitivnih bakterijskih izolatov z določeno MIK tigecklina

Pri po Gramu negativnih bakterijskih izolatih so bile MIK tigecklina v razponu od 0,12 µg/mL do 16 µg/mL. MIK₉₀ med po Gramu negativnimi izolati je bil najvišji pri vrsti *P. aeruginosa* in je znašal 16 µg/mL, medtem ko sta imeli najnižjo vrednost MIK₉₀ tigecklina dve vrsti, in sicer *H. influenzae* ter *E. coli* (0,5 µg/mL) (slika 9).



Slika 9: Število po Gramu negativnih bakterijskih izolatov z določeno MIK tigecklina

4.1.2 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *S. pneumoniae*

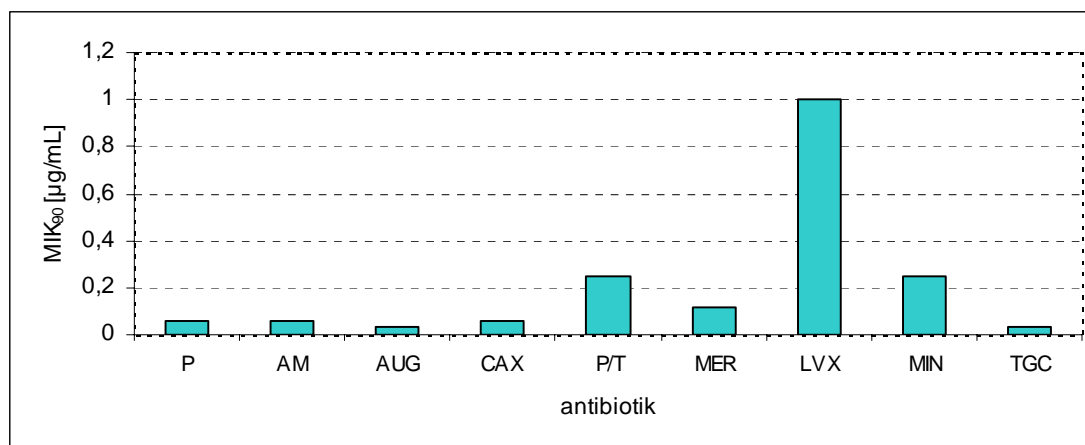
Vsi izolati vrste *S. pneumoniae* so bili občutljivi za meropenem, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, levofloksacin in tetraciklinski antibiotik minociklin. 93,3 % testiranih izolatov je bilo občutljivih za penicilin. Za občutljivost bakterijskih izolatov vrste *S. pneumoniae* za antibiotika tigecklin in piperacilin s tazobaktamom ni interpretacijskih kriterijev. Tako smo za tigecklin določili MIK₉₀, ki je bil 0,03 µg/mL.

Za piperacilin s tazobaktamom je znašal $MIK_{90} \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ (preglednica 8). Najnižji MIK_{90} sta imela amoksicilin s klavulansko kislino in tigecklin, najvišjo vrednost MIK_{90} pa levofloksacin ($1 \mu\text{g/mL}$) (slika 10).

Preglednica 8: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *S. pneumoniae* za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, minociklin in tigecklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
penicilin	15	$\leq 0,06$	14 (93,3)
ampicilin	15	$\leq 0,06$	15 (100)
amoksicilin s klavulansko kislino	15	$\leq 0,03$	15 (100)
ceftriakson	15	0,06	15 (100)
piperacilin s tazobaktamom	15	$\leq 0,25$	N/A
meropenem	15	$\leq 0,12$	15 (100)
levofloksacin	15	1	15 (100)
minociklin	15	$\leq 0,25$	15 (100)
tigecklin	15	0,03	N/A

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom in tigecklin



Slika 10: MIK_{90} za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), minociklin (MIN) in tigecklin (TGC) pri izolatih vrste *S. pneumoniae*

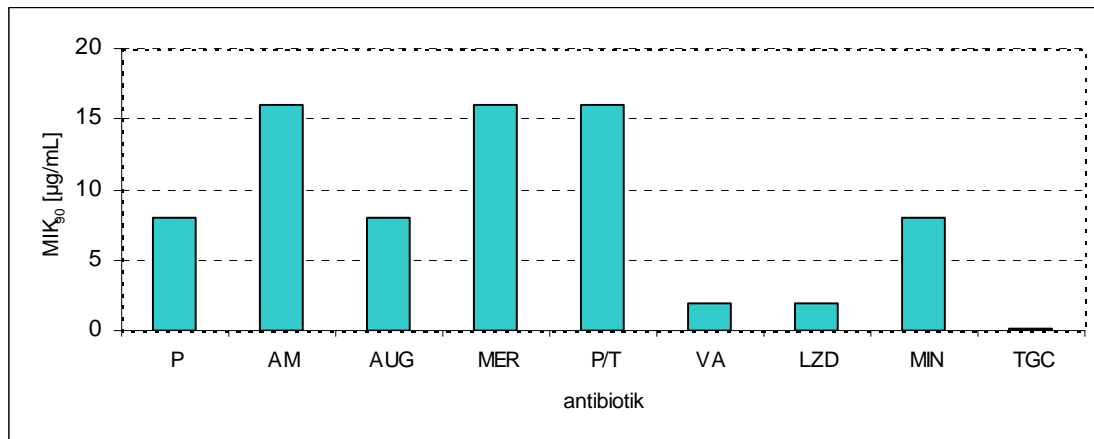
4.1.3 Občutljivost bakterijskih izolatov rodu *Enterococcus*

Iz rodu *Enterococcus* smo testirali 10 izolatov vrste *E. faecalis* in 5 izolatov vrste *E. faecium*. Eden izmed izolatov je bil odporen proti glikopeptidom. V preglednici 9 lahko vidimo, da je bil tigeciklin najučinkovitejši antibiotik, saj so bili vsi izolati zanj občutljivi in je imel tudi najnižji MIK_{90} (0,12 $\mu\text{g/mL}$). Vankomicin in linezolid sta bila učinkovita pri 93,3 % izolatov. 66,7 % izolatov je bilo občutljivih za minociklin. Ampicilin, penicilin, amoksicilin s klavulansko kislino in piperacilin s tazobaktamom so bili enako učinkoviti, in sicer pri 60 % izolatov. Za meropenem ni interpretacijskih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti enterokokov, zato smo določili MIK_{90} , ki je znašal $> 16 \mu\text{g/mL}$. Ampicilin in piperacilin s tazobaktamom sta imela enako vrednost MIK_{90} kot meropenem (slika 11).

Preglednica 9: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Enterococcus* za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, meropenem, piperacilin s tazobaktamom, vankomicin, linezolid, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
penicilin	15	> 8	9 (60)
ampicilin	15	> 16	9 (60)
amoksicilin s klavulansko kislino	15	> 8	9 (60)
meropenem	15	> 16	N/A
piperacilin s tazobaktamom	15	> 16	9 (60)
vankomicin	15	2	14 (93,3)
linezolid	15	2	14 (93,3)
minociklin	15	> 8	10 (66,7)
tigeciklin	15	0,12	15 (100)

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za meropenem



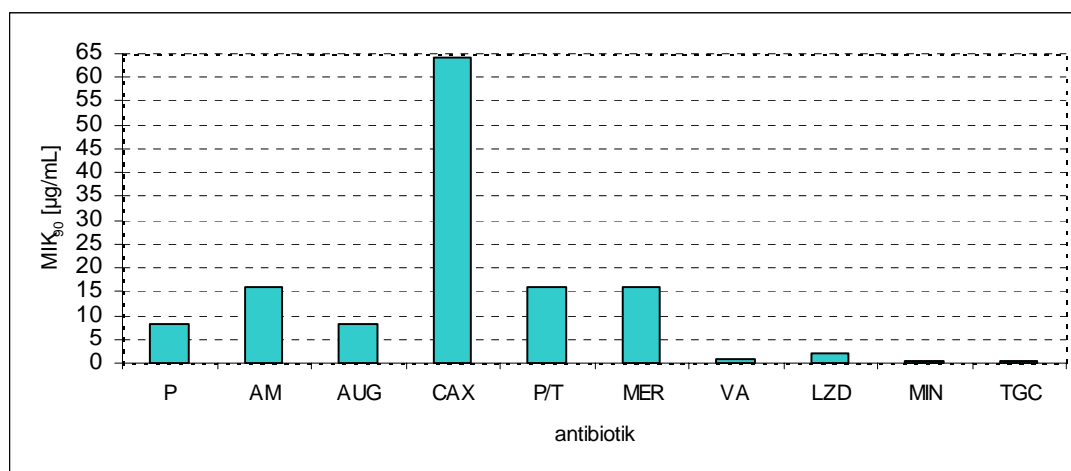
Slika 11: MIC₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksicilin s klavulansko kislino (AUG), meropenem (MER), piperacilin s tazobaktamom (P/T), vankomicin (VA), linezolid (LZD), minociklin (MIN) in tigecklin (TGC) pri izolatih rodu *Enterococcus*

4.1.4 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *S. aureus*

Med 25 testiranimi izolati vrste *S. aureus*, je bilo 6 proti meticilinu odpornih izolatov – MRSA, kar predstavlja 24 %. Vsi izolati vključno z MRSA so bili občutljivi za minociklin, njegov derivat tigecklin, vankomicin in linezolid (preglednica 10). 76 % testiranih izolatov je bilo občutljivih za meropenem, amoksicilin s klavulansko kislino in piperacilin s tazobaktamom. Na sliki 12 lahko vidimo, da sta bila antibiotika penicilin in ampicilin najmanj učinkovita, saj je bilo proti njima odpornih 78 % izolatov in sta imela tudi relativno visoko vrednost MIC₉₀. Najvišjo vrednost MIC₉₀ je imel antibiotik ceftriakson, in sicer > 64 µg/mL.

Preglednica 10: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *S. aureus* za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, vankomicin, linezolid, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK ₉₀ [μg/mL]	Število (%) občutljivih izolatov
penicilin	25	> 8	3 (12)
ampicilin	25	> 16	3 (12)
amoksisicilin s klavulansko kislino	25	> 8	19 (76)
ceftriakson	25	> 64	19 (76)
piperacilin s tazobaktamom	25	> 16	19 (76)
meropenem	25	> 16	19 (76)
vankomicin	25	1	25 (100)
linezolid	25	2	25 (100)
minociklin	25	0,5	25 (100)
tigeciklin	25	0,25	25 (100)



Slika 12: MIC₉₀ za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), vankomicin (VA), linezolid (LZD), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *S. aureus*

4.1.5 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *S. agalactiae*

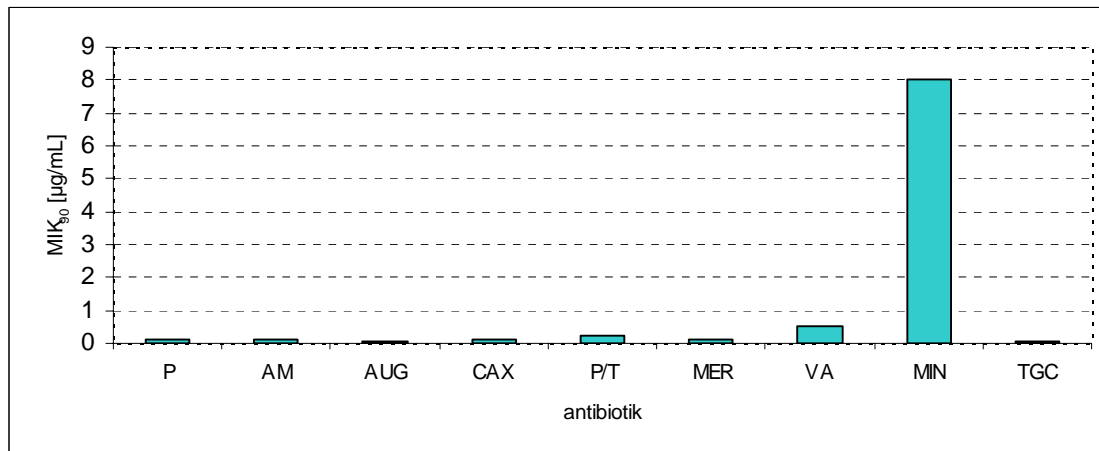
Izolati vrste *S. agalactiae* so bili dobro občutljivi za večino testiranih antibiotikov. Penicilin, ampicilin, tigeciklin, meropenem in vankomicin so bili najučinkovitejši, saj je bil delež občutljivih izolatov 100 %. Za ceftriakson in amoksisicilin s klavulansko kislino je bilo občutljivih 9 od 10 testiranih izolatov (90 %). 80 % izolatov je bilo občutljivih za minociklin (preglednica 11). Za piperacilin s tazobaktamom pa ni interpretacijskih kriterijev občutljivosti in smo določili MIC₉₀, ki je nizek, in sicer 0,25 μg/mL. Na sliki 13

lahko vidimo, da je bilo večina antibiotikov *in vitro* dobro učinkovitih (nizek MIK_{90}), le minociklin je imel visok MIK_{90} , in sicer $> 8 \mu\text{g/mL}$.

Preglednica 11: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *S. agalactiae* za antibiotike: penicilin, ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, vankomicin, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
penicilin	10	0,12	10 (100)
ampicilin	10	0,12	10 (100)
amoksisicilin s klavulansko kislino	10	0,06	9 (90)
ceftriakson	10	0,12	9 (90)
piperacilin s tazobaktamom	10	$\leq 0,25$	N/A
meropenem	10	$\leq 0,12$	10 (100)
vankomicin	10	0,5	10 (100)
minociklin	10	> 8	8 (80)
tigeciklin	10	0,03	10 (100)

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za piperacilin s tazobaktamom



Slika 13: MIK_{90} za penicilin (P), ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), vankomicin (VA), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *S. agalactiae*

4.1.6 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *H. influenzae*

Vsi izolati vrste *H. influenzae* so bili občutljivi za oba antibiotika v kombinaciji z inhibitorji laktamaz beta, in sicer amoksisicilin s klavulansko kislino in piperacilin s tazobaktamom ter na ceftriakson in širokospektralni meropenem (preglednica 12). 14

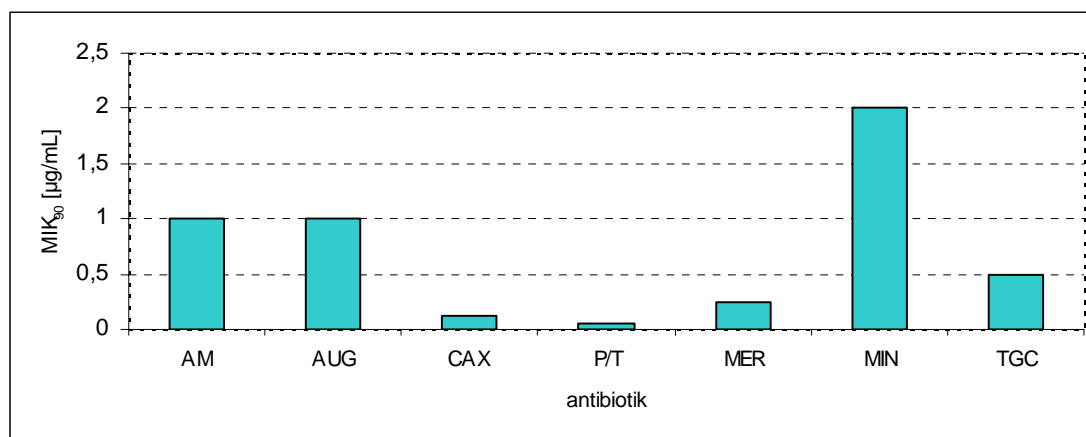
izolatov od 15 testiranih (93,3 %) je bilo občutljivih za ampicilin in minociklin. Ker ni interpretacijskih kriterijev občutljivosti za tigeciklin, smo določili MIK_{90} , ki je 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Preglednica 12: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *H. influenzae* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ampicilin	15	1	14 (93,3)
amoksisicilin s klavulansko kislino	15	1	15 (100)
ceftriakson	15	0,12	15 (100)
piperacilin s tazobaktamom	15	$\leq 0,06$	15 (100)
meropenem	15	0,25	15 (100)
minociklin	15	2	14 (93,3)
tigeciklin	15	0,5	N/A

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za tigeciklin

Kot je razvidno iz slike 14 je bil MIK_{90} za vse antibiotike relativno nizek. Najnižjo vrednost MIK_{90} je imel piperacilin s tazobaktamom ($\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$). Pod 1 $\mu\text{g/mL}$ je znašal MIK_{90} tudi za ceftriakson, meropenem in tigeciklin. MIK_{90} za minociklin pa je bil najvišji, in sicer 2 $\mu\text{g/mL}$.



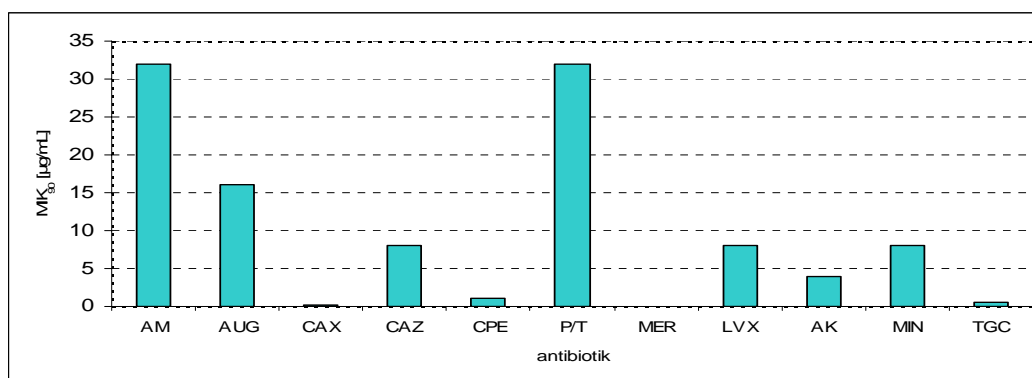
Slika 14: MIK_{90} za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *H. influenzae*

4.1.7 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *E. coli*

Med 25 testiranimi izolati sta 2 izolata izločala laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja – ESBL, kar predstavlja 8 %. Vsi izolati, vključno z ESBL pozitivnimi, so bili občutljivi za meropenem, amikacin in tigeciklin in so imeli tudi nižje vrednosti MIK_{90} (slika 15). 96 % izolatov je bilo občutljivih za ceftazidim, 92 % izolatov pa za ceftriakson in cefepim. Več kot 80 % izolatov je bilo občutljivih za piperacilin s tazobaktamom, medtem ko so bili minociklin (80 % občutljivih), levofloksacin (76 % občutljivih) amoksisicilin s klavulansko kislino (72 % občutljivih) in ampicilin (48 % občutljivih) manj učinkoviti antibiotiki (preglednica 13).

Preglednica 13: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *E.coli* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ampicilin	25	> 32	12 (48)
amoksisicilin s klavulansko kislino	25	16	18 (72)
ceftriakson	25	0,25	23 (92)
caftazidim	25	≤ 8	24 (96)
cefepim	25	1	23 (92)
piperacilin s tazobaktamom	25	32	22 (88)
meropenem	25	$\leq 0,06$	25 (100)
levofloksacin	25	> 8	19 (76)
amikacin	25	4	25 (100)
minociklin	25	8	20 (80)
tigeciklin	25	0,5	25 (100)



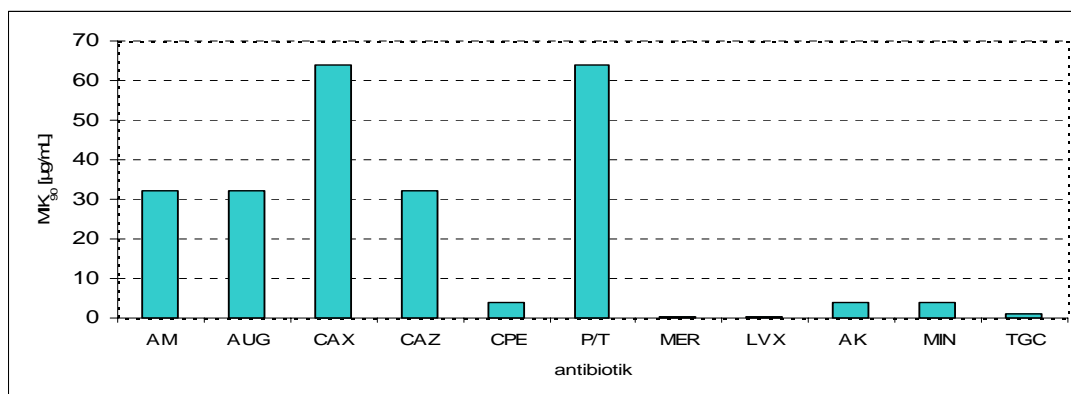
Slika 15: MIK_{90} za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *E. coli*

4.1.8 Občutljivost bakterijskih izolatov rodu *Enterobacter*

Vsi izolati tega rodu so pripadali eni izmed dveh vrst, in sicer 4 izolati vrsti *Enterobacter aerogenes* in 21 izolatov vrsti *Enterobacter cloacae*. Obe vrsti sta bili podobno občutljivi na podobne antibiotike (preglednica 14). Meropenem, tigecklin, cefepim, levofloksacin in amikacin so bili najučinkovitejši antibiotiki, saj so bili vsi izolati občutljivi zanje in so imeli tudi najnižje MIK_{90} (od 0,25 $\mu\text{g/mL}$ do 4 $\mu\text{g/mL}$) (slika 16). 92 % izolatov je bilo občutljivih za minociklin, 80 % izolatov za piperacilin v kombinaciji s tazobaktamom in ceftazidim ter 72 % izolatov za ceftriakson.

Preglednica 14: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Enterobacter* za antibiotike: ampicilin, amoksisicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigecklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ampicilin	25	> 32	0 (0)
amoksisicilin s klavulansko kislino	25	> 32	0 (0)
ceftriakson	25	64	18 (72)
ceftazidim	25	> 32	20 (80)
cefepim	25	4	25 (100)
piperacilin s tazobaktamom	25	64	20 (80)
meropenem	25	0,25	25 (100)
levofloksacin	25	0,5	25 (100)
amikacin	25	4	25 (100)
minociklin	25	4	23 (92)
tigecklin	25	1	25 (100)



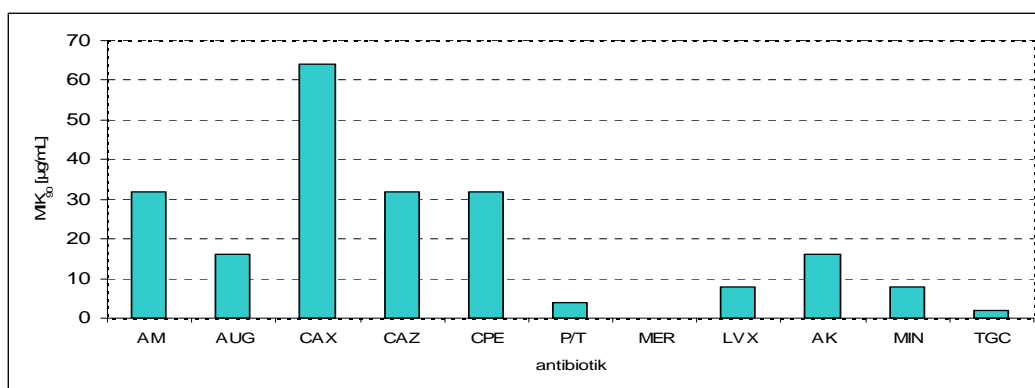
Slika 16: MIK_{90} za ampicilin (AM), amoksisicilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigecklin (TGC) pri izolatih rodu *Enterobacter*

4.1.9 Občutljivost bakterijskih izolatov rodu *Klebsiella*

21 testiranih izolatov rodu *Klebsiella* je pripadalo vrsti *Klebsiella pneumoniae*, med katerimi je bilo 6 izolatov (28,6 %), ki so izločali laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja – ESBL. 4 izolati pa so bili identificirani kot vrsta *Klebsiella oxytoca*. *In vitro* najučinkovitejša antibiotika sta bila meropenem in amikacin, saj so bili vsi izolati (vključno z ESBL pozitivnimi) občutljivi zanju. Tudi tigeciklin je bil dobro učinkovit in je imel drugo najnižjo vrednost MIK_{90} (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 88 % izolatov je bilo občutljivih za levofloksacin, 84 % izolatov pa za amoksisilin s klavulansko kislino, minociklin in cefepim (preglednica 15, slika 17).

Preglednica 15: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Klebsiella* za antibiotike: ampicilin, amoksisilin s klavulansko kislino, ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ampicilin	25	> 32	0 (0)
amoksisilin s klavulansko kislino	25	16	21 (84)
ceftriakson	25	> 64	20 (80)
ceftazidim	25	> 32	19 (78)
cefepim	25	> 32	21 (84)
piperacilin s tazobaktamom	25	4	23 (92)
meropenem	25	$\leq 0,06$	25 (100)
levofloksacin	25	8	22 (88)
amikacin	25	16	25 (100)
minociklin	25	8	21 (84)
tigeciklin	25	2	24 (96)



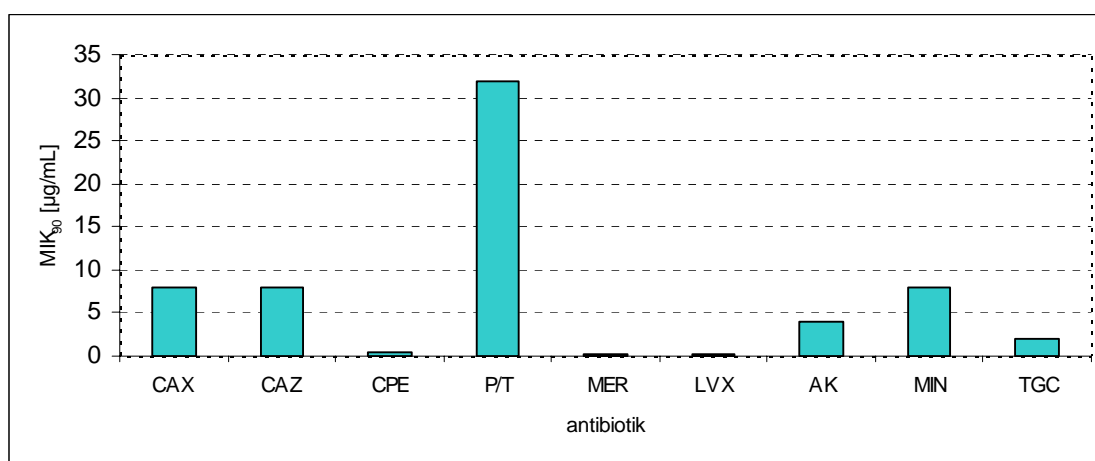
Slika 17: MIK_{90} za ampicilin (AM), amoksisilin s klavulansko kislino (AUG), ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih rodu *Klebsiella*

4.1.10 Občutljivost bakterijskih izolatov rodu *Serratia*

Vsi testirani izolati rodu *Serratia* so pripadali vrsti *Serratia marcescens*. Najučinkovitejši antibiotiki pri izolatih so bili širokospektralna antibiotika meropenem in tigecklin, ceftazidim, cefepim in amikacin, saj so bili vsi izolati zanje občutljivi in so imeli tudi nižje vrednosti MIC_{90} . Dobro učinkovita antibiotika sta bila tudi ceftriakson in levofloksacin, saj je bilo 90 % izolatov občutljivih zanju. 80 % izolatov je bilo občutljivih za piperacilin v kombinaciji s tazobaktamom in 70 % je bilo občutljivih za minociklin (preglednica 16, slika 18).

Preglednica 16: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov rodu *Serratia* za antibiotike: ceftriakson, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigecklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIC_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ceftriakson	10	8	9 (90)
ceftazidim	10	≤ 8	10 (100)
cefepim	10	$\leq 0,5$	10 (100)
piperacilin s tazobaktamom	10	32	8 (80)
meropenem	10	0,12	10 (100)
levofloksacin	10	0,25	9 (90)
amikacin	10	4	10 (100)
minociklin	10	8	7 (70)
tigecklin	10	2	10 (100)



Slika 18: MIC_{90} za ceftriakson (CAX), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigecklin (TGC) pri izolatih rodu *Serratia*

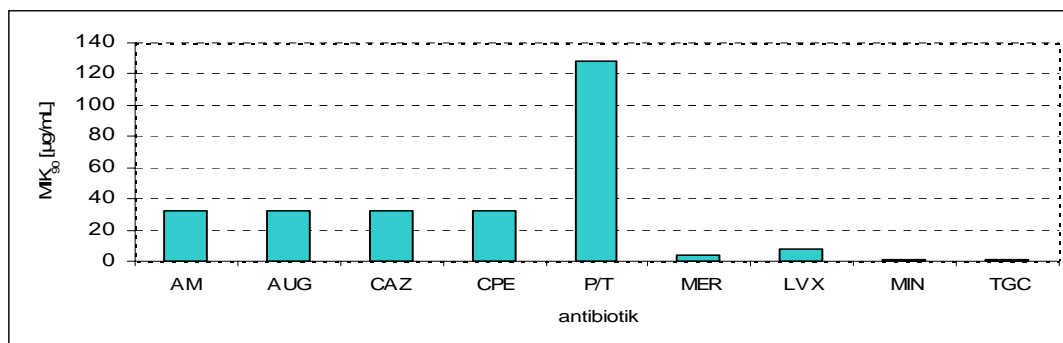
4.1.11 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *A. baumannii*

Če ne upoštevamo občutljivosti za minociklin, tigeciklin in meropenem, so bili izolati *A. baumannii* kar precej odporni proti testiranim antibiotikom (preglednica 17). Le 6,7 % izolatov je bilo občutljivih za cefepim in piperacilin v kombinaciji s tazobaktamom. Ker ni interpretacijskih kriterijev občutljivosti za antibiotike amoksisilin s klavulansko kislino ampicilin in tigeciklin, smo določili MIK_{90} , ki je bil za prva dva antibiotika visok, in sicer $> 32 \mu\text{g/mL}$, medtem ko je bil za tigeciklin $1 \mu\text{g/mL}$. 100 % občutljivi so bili vsi izolati *A. baumannii* za minociklin in je bil najučinkovitejši antibiotik, saj je imel najnižji MIK_{90} ($1 \mu\text{g/mL}$) poleg tigeciklina (slika 19).

Preglednica 17: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *A. baumannii* za antibiotike: ampicilin, amoksisilin s klavulansko kislino, ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, minociklin in tigeciklin

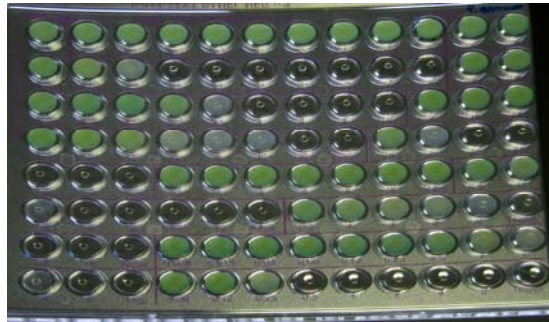
Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ampicilin	15	> 32	N/A
amoksisilin s klavulansko kislino	15	> 32	N/A
ceftazidim	15	> 32	0 (0)
cefepim	15	> 32	1 (6,7)
piperacilin s tazobaktamom	15	> 128	1 (6,7)
meropenem	15	4	14 (93,3)
levofloksacin	15	> 8	2 (13,3)
minociklin	15	1	15 (100)
tigeciklin	15	1	N/A

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za ampicilin, amoksisilin s klavulansko kislino in tigeciklin



Slika 19: MIK_{90} za ampicilin (AM), amoksisilin s klavulansko kislino (AUG), ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), minociklin (MIN) in tigeciklin (TGC) pri izolatih vrste *A. baumannii*

4.1.12 Občutljivost bakterijskih izolatov vrste *P. aeruginosa*



Slika 20: Rezultat mikrodilucijske metode pri enem od izolatov vrste *P. aeruginosa*

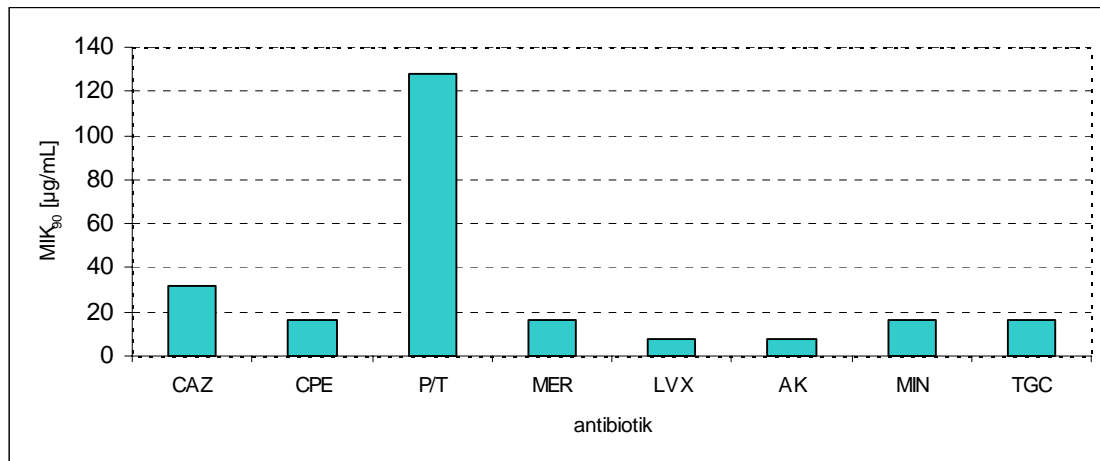
Slika 20 prikazuje rezultate mikrodilucijske metode enega izolata iz vrste *P. aeruginosa*. MIK za posamezen antibiotik je bila prva vdolbinica, v kateri ni bilo prisotne bakterijske rasti.

Najučinkovitejši antibiotik je bil amikacin, saj je bilo 95 % izolatov vrste *P. aeruginosa* občutljivih zanj. Med vsemi testiranimi izolati vrste *P. aeruginosa* je bilo 85 % izolatov občutljivih za piperacilin s tazobaktamom, 80 % za levofloksacin in 75 % za meropenem in ceftazidim. Minociklin je bil slabo učinkovit, saj je bilo 90 % izolatov odpornih proti njemu. Ker za tigeciklin ni kriterijev za opredeljevanje občutljivosti, smo določili MIK_{90} , ki je znašal 16 $\mu\text{g/mL}$. Najnižjo vrednost MIK_{90} med testiranimi antibiotiki pa je imel amikacin, in sicer 8 $\mu\text{g/mL}$ (preglednica 18, slika 21).

Preglednica 18: Število in delež občutljivih bakterijskih izolatov vrste *P. aeruginosa* za antibiotike: ceftazidim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom, meropenem, levofloksacin, amikacin, minociklin in tigeciklin

Antibiotik	Število testiranih izolatov	MIK_{90} [$\mu\text{g/mL}$]	Število (%) občutljivih izolatov
ceftazidim	20	32	15 (75)
cefepim	20	16	13 (65)
piperacilin s tazobaktamom	20	128	17 (85)
meropenem	20	16	15 (75)
levofloksacin	20	> 8	16 (80)
amikacin	20	8	19 (95)
minociklin	20	> 16	2 (10)
tigeciklin	20	16	N/A

Legenda: N/A – ni podatka, ker ni oblikovanih kriterijev občutljivosti za tigeciklin



Slika 21: MIC₉₀ za ceftazidim (CAZ), cefepim (CPE), piperacilin s tazobaktamom (P/T), meropenem (MER), levofloksacin (LVX), amikacin (AK), minociklin (MIN) in tigeceklin (TGC) pri izolatih vrste *P. aeruginosa*

4.2 METODA DIFUZIJSKEGA GRADIENTA

Z metodo difuzijskega gradienta smo testirali 67 klinično pomembnih izolatov, ki smo jih izbrali iz zbirke izolatov Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Pri vseh izolatih smo ugotavljali odpornost proti oziroma občutljivost za izbrani antibiotik tigeceklin. Vsi izolati so spadali med večkratno odporne bakterije, med katerimi so bili 3 izolati MRSA, 2 izolata *E. coli* – ESBL pozitivna, 37 izolatov *K. pneumoniae* – ESBL pozitivni in 25 izolatov vrste *S. maltophilia*.

4.2.1 Občutljivost bakterijskih izolatov MRSA za tigeceklin

V preglednici 19 je prikazana primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta 3 bakterijskih izolatov MRSA, pri katerih smo ugotavljali občutljivost za tigeceklin. Na podlagi kriterijev občutljivosti za tigeceklin s strani ameriške organizacije FDA (preglednica 5) smo posamezne izolate uvrstili v kategorije občutljiv (S), mejno občutljiv – intermediaren (I) ali odporen (R). Kot je razvidno iz preglednice 19, so bili vsi 3 izolati MRSA z disk difuzijsko metodo opredeljeni kot

mejno občutljivi za tigeciklin. Z metodo difuzijskega gradienta pa so bili vsi izolati MRSA opredeljeni kot občutljivi za tigeciklin.

Preglednica 19: Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta bakterijskih izolatov MRSA za antibiotik tigeciklin

Tigeciklin – disk difuzijska metoda			Tigeciklin – MIK		
S	I	R	S	I	R
0	3	0	3	0	0

4.2.2 Občutljivost ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *E. coli* za tigeciklin

Kot je razvidno iz preglednice 20, smo oba ESBL pozitivna testirana izolata *E. coli*, na podlagi rezultatov disk difuzijske metode, opredelili kot mejno občutljiva za tigeciklin. Z metodo difuzijskega gradienta pa sta bila izolata opredeljena kot občutljiva za tigeciklin (preglednica 5).

Preglednica 20: Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *E. coli* za antibiotik tigeciklin

Tigeciklin – disk difuzijska metoda			Tigeciklin – MIK		
S	I	R	S	I	R
0	2	0	2	0	0

4.2.3 Občutljivost ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *K. pneumoniae* za tigeciklin

Z disk difuzijsko metodo je bilo 26 ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov vrste *K. pneumoniae* opredeljenih kot mejno občutljivi za tigeciklin, 11 izolatov pa kot odporni proti tigeciklinu. Če primerjamo rezultate disk difuzijske metode z metodo difuzijskega gradienta, vidimo kar velike razlike v občutljivosti posameznih izolatov. 13 izolatov je bilo glede na MIK občutljivih, 20 mejno občutljivih in le 4 izolati so bili odporni proti tigeciklinu (preglednica 21).

Preglednica 21: Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov *K. pneumoniae* za antibiotik tigeciklin

Tigeciklin – disk difuzijska metoda			Tigeciklin – MIK		
S	I	R	S	I	R
0	26	11	13	20	4

4.2.4 Občutljivost bakterijskih izolatov *S. maltophilia* za tigeciklin

V preglednici 23 so predstavljeni rezultati posameznih izolatov vrste *S. maltophilia*. Rezultate disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta smo predstavili za vsak izolat posebej in jih nismo uvrščali v kategorije občutljivi, mejno občutljivi ali odporni, ker še ni oblikovanih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin. Za posamezne izolate ni bilo rezultatov disk difuzijske metode (N/A). Med 25 izolati je bil premer inhibicijske cone rasti za tigeciklin v razponu od 16,9 mm do 25,2 mm. MIK tigeciklina pa je bil v razponu od 0,38 µg/mL (nizka vrednost MIK) do 8 µg/mL. MIK₉₀ tigeciklina za testirane izolate je znašal 6 µg/mL in je bil relativno visok.

Preglednica 22: Primerjava rezultatov disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta bakterijskih izolatov *S. maltophilia* za antibiotik tigeciklin

Št. izolata	Tigeciklin – disk difuzijska metoda [mm]	Tigeciklin – MIK [µg/mL]
1	18	4
2	17,2	2
3	N/A	1
4	18,7	1
5	16,9	4
6	19,2	2
7	16,9	1
8	16,9	3
9	22,72	1,5
10	22,9	1
11	25,2	0,75
12	22,8	1,5
13	N/A	8
14	N/A	8
15	N/A	3
16	N/A	1,5
17	N/A	1
18	N/A	0,38
19	N/A	1
20	N/A	2
21	N/A	6
22	N/A	2
23	N/A	1,5
24	N/A	4
25	N/A	1

Legenda: N/A – ni podatka

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi vse pogostejšega pojava bakterijskih izolatov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom, je zdravljenje zapletenih bolnišničnih okužb vse težje in potreba po razvoju novih učinkovitih protibakterijskih sredstev vse večja. Med najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb spadajo tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije, med katerimi izstopajo večkratno odporne bakterije kot so MRSA, VRE in enterobakterije, ki izločajo ESBL (Tenover, 2001).

V zadnjem času so raziskave usmerjene predvsem v razvoj novih antibiotikov in eden izmed njih je tudi tigeciklin. Po svojem delovanju je širokospektralni antibiotik, ki spada v novo skupino glicilciklinskih antibiotikov in s svojim delovanjem, ki je podobno delovanju tetraciklinov, zavira sintezo beljakovin. Njegov širok protimikrobni spekter omogoča osnovno namembnost, ki je zdravljenje okužb kože in podkožja s po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami ter težkih okužb v trebušni votlini (Greer, 2006).

Izbor antibiotikov je za zdravljenje bakterijskih okužb ključnega pomena in njihova uporaba usmerja evolucijo medicinsko pomembnih bakterij v razvoj odpornih vrst, kar se kaže s vse pogostejšimi neuspehi antibiotičnega zdravljenja. Ugotavljanje razširjenosti izolatov odpornih proti pogosto izbranim antibiotikom je zato ključnega pomena, saj je v primeru porasta deleža odpornih izolatov proti posameznemu antibiotiku smiselno njegovo uporabo omejiti. Tako smo v raziskavi za 200 bakterijskih izolatov ugotavljali občutljivost za oz. odpornost proti najpogostje uporabljanim antibiotikom, in sicer penicilinu, ampicilinu, amoksicilinu s klavulansko kislino, ceftriaksonu, ceftazidimu, cefepimu, piperacilinu s tazobaktamom, meropenemu, vankomicinu, linezolidu, levofloksacinu, amikacinu, minociklinu ter proti novemu antibiotiku tigeciklinu, ki v Sloveniji še ni bil uporabljen.

5.1.1 Mikrodilucijska metoda

5.1.1.1 Občutljivost bakterijskih izolatov za tigeciklin

Ker CLSI oz. ameriška organizacija FDA še nista oblikovali interpretacijskih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin za izolate vrste *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* in rodu *Enterococcus* – VRE, smo za vse izolate določili MIK₉₀ tigeciklina. Izolate, za katere so oblikovani kriteriji občutljivosti za tigeciklin, pa smo opredelili tudi kot občutljive, mejno občutljive ali odporne. Tako smo med 135 izolati 99,3 % izolatov opredelili kot občutljive za tigeciklin, 1 izolat smo opredelili kot mejno občutljiv, niti en izolat med testiranimi vrstami, za katere so že oblikovani kriteriji za interpretacijo občutljivosti, ni bil odporen proti tigeciklinu. To nam nakazuje, da je tigeciklin zaenkrat *in vitro* dobro učinkovit proti večini najpogostejših bakterijskih povzročiteljev okužb.

Po pričakovanjih so bili MIK₉₀ tigeciklina za večino izolatov relativno nizki, in sicer od 0,03 µg/mL do 2 µg/mL, izstopal je le MIK₉₀ izolatov vrste *P. aeruginosa*, saj je znašal 16 µg/mL. Ti rezultati so podobni rezultatom raziskav v drugih državah, kjer je bil MIK₉₀ tigeciklina za izolate vrste *P. aeruginosa* ≥ 32 µg/mL, medtem ko je bil MIK₉₀ tigeciklina za vse ostale izolate v razponu od 0,12 µg/mL do 4 µg/mL (Reinert in sod., 2007). Iz preglednice 7 lahko opazimo, da so bile vrednosti MIK₉₀ pri izolatih, ki smo jih vključili v raziskavo, precej nižje za izolate po Gramu pozitivnih bakterij ($\leq 0,25$ µg/mL) kot po Gramu negativnih bakterij ($\geq 0,5$ µg/mL).

5.1.1.2 Občutljivost izolatov vrste *S. pneumoniae* za antibiotike

Večina izolatov vrste *S. pneumoniae* je bila dobro občutljiva za testirane antibiotike. Kljub temu, da v zadnjem času narašča delež odpornih izolatov proti penicilinu (Beekmann in sod., 2005), ki je še vedno zdravilo prvega izbora, je bil med 15 testiranimi izolati le eden opredeljen kot mejno občutljiv za penicilin, vendar pa je bil občutljiv za ampicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, ceftriakson, meropenem, levofloksacin in tetraciklinski antibiotik minociklin. Tigeciklin je bil pričakovano *in vitro* dobro učinkovit

proti vsem pnevmokokom. Rast testiranih izolatov je bila inhibirana že pri nizki koncentraciji tigecklina (0,03 µg/mL). Tudi ostali antibiotiki so imeli zelo nizek MIK₉₀, kar kaže na dejstvo, da so izolati *S. pneumoniae* še vedno dobro občutljivi za večino uporabljenih antibiotikov. Najvišjo vrednost MIK₉₀ je imel levofloksacin iz skupine fluorokinolonov, in sicer 1 µg/mL, vendar so bili tudi vsi izolati zanj občutljivi.

5.1.1.3 Občutljivost izolatov rodu *Enterococcus* za antibiotike

Izolati vrste *E. faecalis* in *E. faecium* so bili z izjemo tigecklina slabše občutljivi za vse testirane antibiotike. Na sliki 11 lahko vidimo, da je bila vrednost MIK₉₀ tigecklina med vsemi antibiotiki najnižja, in sicer je znašala 0,12 µg/mL, pri drugih antibiotikih pa je bila vrednost MIK₉₀ od 2 µg/mL (vankomicin, linezolid) do > 16 µg/mL (meropenem, ampicilin, piperacilin s tazobaktamom). Tako je bil tigecklin *in vitro* najbolj učinkovit antibiotik, ki smo jih testirali. Vendar pa se bo lahko v prihodnosti občutljivost izolatov rodu *Enterococcus* za tigecklin ob njegovi nekritični uporabi zmanjševala. V Nemčiji so namreč v začetku leta 2007 že izolirali prvi izolat *E. faecalis*, ki je bil odporen proti tigecklinu. Mehanizem odpornosti tega izolata proti tigecklinu še ni pojasnjen (Werner in sod., 2008).

Eden izmed izolatov vrste *E. faecium* je bil odporen proti glikopeptidom, in sicer proti vankomicinu, kar predstavlja 6,7 %. Delež izolatov VRE je bil v naši raziskavi za polovico manjši kot po podatkih raziskave za Evropo, kjer je delež VRE med testiranimi izolati *E. faecium* 12 % (Reinert in sod., 2007). MIK tigecklina pri našem izolatu VRE je bil 0,03 µg/mL. Presenetljiva je bila tudi nizka občutljivost naših izolatov za ampicilin in penicilin (40 % odpornih izolatov), saj so bili vsi izolati pri zgoraj omenjeni raziskavi občutljivi za ta dva antibiotika. Možen razlog je lahko v njuni pogostejši uporabi za zdravljenje v Sloveniji kot drugje po Evropi. Zanimiv je tudi delež (33,3 %) odpornih izolatov proti minociklinu, ki je po svoji zgradbi zelo podoben tigecklinu.

5.1.1.4 Občutljivost izolatov vrste *S. aureus* za antibiotike

Pogostost pojava proti meticilinu odpornih izolatov vrste *S. aureus* – MRSA kot bolnišničnih patogenov je vse večja. V naši raziskavi je bilo med 25 testiranimi izolati *S. aureus* 6 izolatov MRSA, kar je predstavljalo 24 %. V Evropi je bil delež MRSA med izolati *S. aureus*, pri katerih so ugotavljali občutljivost za tigeciklin, leta 2007 podoben, in sicer 25,1 % (Reinert in sod., 2007), medtem ko je bil delež MRSA v ZDA leta 2006 precej višji (52,0 %) (Waites in sod., 2006).

In vitro najbolj učinkoviti antibiotiki tako za meticilin občutljive izolate kot MRSA so bili tigeciklin, minociklin, vankomicin in linezolid, saj so bili vsi izolati občutljivi zanje. Najnižji MİK₉₀ sta imela tigeciklin (0,25 µg/mL) in minociklin (0,5 µg/mL), med katerima ni bistvene razlike. V primeru boljše *in vitro* učinkovitosti tigeciklina, bi lahko bil razlog v prisotnosti gena *tet M*, za katerega ima zapis večina izolatov, ki so odporni proti tetraciklinom. Protein Tet M namreč zaščiti ribosom pred delovanjem tetraciklinov in so izolati posledično odporni tudi proti minociklinu (Milatovic in sod., 2003). Tigeciklin pa se na ribosom veže z veliko afiniteto in je moč vezi med njim in ribosomom premočna, da bi jo protein Tet M prekinil (Zhanel in sod., 2004). *In vitro* najmanj učinkovita sta bila ampicilin in penicilin, saj je bilo 88 % izolatov odpornih proti njima. Na podlagi rezultatov torej ta dva antibiotika nista ustrezna za zdravljenje okužb z izolati *S. aureus*.

5.1.1.5 Občutljivost izolatov vrste *S. agalactiae* za antibiotike

Tigeciklin je bil pričakovano dobro *in vitro* učinkovit za izolate vrste *S. agalactiae*, saj so bili vsi izolati zanj občutljivi. Poleg tigeciklina so bili tudi penicilin, ampicilin, meropenem in vankomicin dobro *in vitro* učinkoviti. 90 % izolatov je bilo občutljivih za amoksicilin s klavulansko kislino in ceftriakson. Na sliki 14 lahko opazimo, da je bil MİK₉₀ za vse omenjene antibiotike zelo nizek (od 0,03 µg/mL za tigeciklin do 0,5 µg/mL za vankomicin). Med vsemi testiranimi antibiotiki je bil izjema le minociklin, saj je bilo 20 % izolatov odpornih proti njemu in je imel tudi najvišji MİK₉₀, in sicer > 8 µg/mL. Vse izolate vrste *S. agalactiae*, ki imajo MİK ≥ 8 µg/mL, se opredeli kot odporne proti

minociklinu, pri nas pa je 80 % testiranih izolatov občutljivih za minociklin. Določena visoka vrednost za MIK_{90} je posledica majhnega števila testiranih izolatov (10 izolatov). Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so izolati vrste *S. agalactiae* še vedno dobro občutljivi za večino testiranih antibiotikov, izjema je le minociklin.

5.1.1.6 Občutljivost izolatov vrste *H. influenzae* za antibiotike

Večina testiranih antibiotikov je bilo dobro *in vitro* učinkovitih proti izolatom vrste *H. influenzae*, saj so bile vse vrednosti MIK_{90} nizke (pod 2 $\mu\text{g/mL}$). Vsi izolati so bili občutljivi za piperacilin s tazobaktamom (najnižji MIK_{90}), ceftriakson, meropenem in amoksicilin s klavulansko kislino, medtem ko je bilo 93,3 % izolatov občutljivih za ampicilin in minociklin, ki je imel tudi najvišji MIK_{90} , in sicer 2 $\mu\text{g/mL}$. Čeprav za tigeciklin ni oblikovanih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti, lahko na podlagi nizke vrednosti MIK_{90} sklepamo, da je bil dobro *in vitro* učinkovit proti izolatom vrste *H. influenzae*. Vendar pa sta imela piperacilin s tazobaktamom in ceftriakson 8-krat oz. 4-krat nižji MIK_{90} kot tigeciklin, in so dobljeni rezultati podobni rezultatom nizozemske raziskave za občutljivost evropskih izolatov za tigeciklin, kjer so testirali 103 izolate vrste *H. influenzae*. MIK_{90} za piperacilin s tazobaktamom in ceftriakson je bil $\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$, MIK_{90} tigeciklina pa 1 $\mu\text{g/mL}$ (Milatovic in sod., 2003).

5.1.1.7 Občutljivost izolatov vrste *E. coli* za antibiotike

Pogostost pojava izolatov vrste *E. coli*, ki so izločali ESBL, je bila 8 %. Torej je bilo med 25 testiranimi izolati 6 izolatov, ki so v zunanje okolje izločali encime ESBL. Podatki se ujemajo z rezultati raziskave za Evropo v letu 2007, kjer je 7,6 % testiranih izolatov izločalo encime ESBL (Reinert in sod., 2007). *In vitro* najbolj učinkoviti antibiotiki za izolate vrste *E. coli*, vključno z ESBL pozitivnimi, so bili širokospektralni meropenem, tigeciklin in amikacin, saj so bili vsi izolati občutljivi zanje. Ceftazidim (96 % občutljivih), ceftriakson (92 % občutljivih) kot predstavnika cefalosporinov 3. generacije in cefepim (92 % občutljivih) so bili tudi *in vitro* dobro učinkoviti proti izolatom vrste *E. coli*. Levofloksacin, minociklin, amoksicilin s klavulansko kislino, piperacilin s tazobaktamom so bili nekoliko slabše *in vitro* učinkoviti in so imeli tudi višje vrednosti

MIK₉₀, in sicer od 4 µg/mL do 32 µg/mL. 52 % izolatov pa je bilo odpornih proti širokospektralnemu ampicilinu in je bil tako *in vitro* najmanj učinkovit antibiotik. Tigeciklin je bil dobro *in vitro* učinkovit proti vsem testiranim izolatom vrste *E. coli*, vključno z ESBL pozitivnimi, in bo v prihodnosti verjetno pomembno zdravilo za zdravljenje okužb tudi z večkratno odpornimi izolati vrste *E. coli*. Razlog za njegovo učinkovitost je verjetno v neobčutljivosti za proteine Tet A in Tet B, ki so pri nekaterih po Gramu negativnih bakterijah odgovorni za odpornost proti tetraciklinu in minociklinu, saj omogočajo njun iznos iz bakterijske celice. Učinkovitost tigeciklina je lahko prav zaradi drugačne kemične zgradbe kot pri tetraciklinu in minociklinu (Zhanel in sod., 2004).

5.1.1.8 Občutljivost izolatov rodu *Enterobacter* za antibiotike

Izolati, ki smo jih testirali, so pripadali vrstama *E. cloacae* in *E. aerogenes*. Občutljivost izolatov za antibiotike se med vrstama ni bistveno razlikovala. Najbolj učinkoviti antibiotiki za izolate rodu *Enterobacter* so bili pričakovano meropenem, levofloksacin, cefepim in tigeciklin, saj so bili vsi izolati zanje občutljivi. Med vsemi testiranimi antibiotiki je imel najnižji MIK₉₀ meropenem (0,25 µg/mL), najvišjo vrednost pa amoksisicilin s klavulansko kislino (> 32 µg/mL). Vsi izolati so bili namreč odporni proti njemu, kar se ujema z dejstvom, da so bakterije tega rodu naravno odporne proti amoksisicilinu v kombinaciji z zaviralci laktamaz beta (npr. klavulanska kislina). 92 % izolatov je bilo občutljivih za minociklin, 80 % za ceftazidim, 72 % pa za ceftriakson, ki je imel tudi najvišjo vrednost MIK₉₀, in sicer 64 µg/mL. Tigeciklin je bil torej *in vitro* bolj učinkovit kot minociklin, kar potrjuje, da je tigeciklin neobčutljiv za proteine, ki iznašajo antibiotike iz bakterijske celice in pogojujejo odpornost proti minociklinu.

5.1.1.9 Občutljivost izolatov rodu *Klebsiella* za antibiotike

84 % izolatov rodu *Klebsiella* je pripadalo vrsti *K. pneumoniae*. Med njimi je bilo 28,6 % izolatov, ki so izločali ESBL. 16 % izolatov pa je pripadalo vrsti *K. oxytoca*. Med vsemi testiranimi antibiotiki sta bila najučinkovitejša meropenem (najnižji MIK₉₀, in sicer

$\leq 0,06 \mu\text{g/mL}$) in amikacin, saj so bili vsi izolati, vključno z ESBL pozitivnimi, zanju občutljivi. Drugo najnižjo vrednost MIK_{90} pa je imel tigeciklin, in sicer $2 \mu\text{g/mL}$, zanj je bilo občutljivih 96 % izolatov. Piperacilin s tazobaktamom, levofloksacin, minociklin, cefepim, amoksisicilin s klavulansko kislino in ceftazidim so *in vitro* nekoliko manj učinkoviti, vendar še vedno je zanje občutljivih nad 75 % izolatov tega rodu. Leta 2007 je bil imipenem, ki spada v isto skupino antibiotikov kot meropenem, najučinkovitejši antibiotik za izolate tega rodu, vključno za ESBL pozitivne, pa tudi tigeciklin je bil *in vitro* dobro učinkovit za večino izolatov (Reinert in sod., 2007), kar je v skladu z našimi rezultati.

5.1.1.10 Občutljivost izolatov rodu *Serratia* za antibiotike

Vse testirane izolate smo uvrstili v vrsto *S. marcescens*, pri katerih sta bila najučinkovitejša antibiotika ponovno meropenem in tigeciklin, poleg njiju pa tudi cefepim, ceftazidim in amikacin, saj so bili vsi izolati zanje občutljivi. Najnižjo vrednost MIK_{90} ($0,12 \mu\text{g/mL}$) je imel meropenem, kar kaže na dejstvo, da je kot širokospektralni antibiotik še vedno *in vitro* zelo dobro učinkovit proti izolatom tega rodu. MIK_{90} tigeciklina je bil $2 \mu\text{g/mL}$, in se ujema z rezultati raziskave iz leta 2007 (Reinert in sod., 2007), medtem ko je nekoliko višji v primerjavi z rezultati raziskave za leto 2006 za ZDA, kjer znaša MIK_{90} $1 \mu\text{g/mL}$ (Waites in sod., 2006) oz. nekoliko nižji v primerjavi z rezultati raziskave za Evropo iz leta 2002, kjer je MIK_{90} tigeciklina $4 \mu\text{g/mL}$ (Milatovic in sod., 2003). 90 % izolatov je bilo občutljivih za ceftriakson in levofloksacin. *In vitro* najmanj učinkovit pa je bil minociklin, saj je bilo kar 30 % izolatov odpornih proti njemu.

5.1.1.11 Občutljivost izolatov vrste *A. baumannii* za antibiotike

Pri izolatih vrste *A. baumannii* opazimo, da je bila večina testiranih antibiotikov *in vitro* slabo učinkovitih, če seveda ne upoštevamo rezultat občutljivosti za minociklin, za katerega so bili vsi izolati občutljivi. Ti podatki kažejo na dejstvo, da so izolati te vrste precej odporni proti večini antibiotikov in da je problem zdravljenja okužb z

A. baumannii vse večji. V svetu veljajo karbapenemi kot antibiotiki izbora za zdravljenje večkratno odpornih izolatov te vrste, saj so pogosto odporni proti aminoglikozidom, cefalosporinom, betalaktamom, kinolonom in tetraciklinom. 14 od 15 naših izolatov je bilo občutljivih za meropenem. Vendar pa se tudi v našem okolju pojavljajo izolati, ki nosijo zapis za encime karbapenemaze, ki so odgovorne za pojav odpornosti izolatov *A. baumannii* proti karbapenemom. Zato je v tem primeru kolistin največkrat antibiotik zadnjega izbora (Henwood in sod., 2002). Vzrokov za večkratno odpornost izolatov te vrste je verjetno več. Prisotnost proteinov Tet A in Tet B, ki omogočajo iznos antibiotikov iz bakterijske celice, je odgovorna za odpornost proti tetraciklinu in minociklinu, vendar ne proti tigeciklinu. Tudi zapis za protein Tet M, ki ščiti ribosom pred delovanjem tetraciklina, doksiciklina in minociklina, je razlog za odpornost. Za odpornost proti betalaktamom so odgovorne laktamaze beta, ki jih izolati izločajo v okolje, pa tudi sprememba membranskih proteinov, ki zmanjšajo prepustnost zunanje membrane in preprečijo vstop betalaktamom (Henwood in sod., 2002; Perez in sod., 2007). Za tigeciklin ni interpretacijskih kriterijev za opredeljevanje občutljivosti, zato smo določili MIK₉₀, ki je bil enak kot za minociklin, in sicer 1 µg/mL. Izolati tega rodu so naravno odporni proti ampicilinu, amoksicilinu ter 1. generaciji cefalosporinov, zato je razumljivo, da je MIK₉₀ za ampicilin visok (> 32 µg/mL). 93,3 % izolatov je bilo odpornih proti cefepimu in piperacilinu s tazobaktamom, vsi izolati pa so bili odporni proti ceftazidimu.

5.1.1.12 Občutljivost izolatov vrste *P. aeruginosa* za antibiotike

Rezultati občutljivosti izolatov vrste *P. aeruginosa*, vključenih v našo raziskavo, se popolnoma ujemajo z rezultati raziskave za Evropo za leto 2007 (Reinert in sod., 2007), saj je bil med vsemi testiranimi antibiotiki najučinkovitejši amikacin, za katerega je bilo občutljivih 95 % izolatov vrste in je imel tudi najnižjo vrednost MIK₉₀ (8 µg/mL), piperacilin s tazobaktamom pa je bil drugi najučinkovitejši antibiotik (85 % občutljivih). Tudi ceftazidim kot anti-pseudomonadni cefalosporin 3. generacije in meropenem sta bila dobro učinkovita, saj je bilo zanju občutljivih 75 % izolatov. Izolati te vrste so podobno kot izolati vrste *A. baumannii* naravno odporni proti številnim antibiotikom (ampicilin, amoksicilin, amoksicilin s klavulansko kislino, 1. in 2. generacija cefalosporinov,

ceftrikson, cefotaksim) in je potreba po novih učinkovitih antibiotikih vse večja (Waites in sod., 2006). Za zdravljenje okužb z bakterijami vrste *P. aeruginosa* pa se tigeciklin kot nov antibiotik ni izkazal za *in vitro* učinkovitega (Reinert in sod., 2007) in tudi njegova vrednost MIK_{90} je bila visoka (v našem primeru 16 $\mu\text{g/mL}$).

5.1.2 Metoda difuzijskega gradienta

V raziskavi smo želeli s testiranjem 67 klinično pomembnih izolatov primerjati rezultate disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta za določanje občutljivosti za glicilciklinski antibiotik tigeciklin pri večkratno odpornih izolatih MRSA, *E. coli* in *K. pneumoniae*, ki izločajo ESBL ter *S. maltophilia*.

Trije testirani izolati MRSA so bili po disk difuzijski metodi opredeljeni kot mejno občutljivi za tigeciklin, medtem ko smo vse 3 z metodo difuzijskega gradienta opredelili kot občutljive. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je disk difuzijska metoda manj natančna kot metoda difuzijskega gradienta. Z metodo difuzijskega gradienta (visoka občutljivost) določimo tudi MIK , kar je lahko zelo pomembno pri samem zdravljenju.

Tudi 2 izolata vrste *E. coli*, ki sta izločala ESBL, smo po testiranju z metodo difuzijskega gradienta opredelili kot občutljiva za tigeciklin, medtem ko sta bila z disk difuzijsko metodo opredeljena kot mejno občutljiva.

Obe metodi smo primerjali tudi pri testiranju 37 ESBL pozitivnih bakterijskih izolatov vrste *K. pneumoniae*. Med njimi je bilo 26 (70,3 %) izolatov opredeljenih kot mejno občutljivih za tigeciklin, 11 (29,7 %) izolatov pa je bilo odpornih proti tigeciklinu. Metoda difuzijskega gradienta pa je bila pričakovano bolj natančna, in sicer so bili le 4 izolati (10,8 %) odporni proti tigeciklinu, 20 (54,1 %) izolatov smo opredelili kot mejno občutljive in 13 (35,1 %) izolatov kot občutljive za tigeciklin.

Torej lahko iz dobljenih rezultatov sklepamo, da so ESBL pozitivni izolati vrste *E. coli* in *K. pneumoniae* lahko dobro občutljivi za tigeciklin in je za rutinsko testiranje občutljivosti za tigeciklin v mikrobiološkem laboratoriju primerna metoda, s katero določimo MIK antibiotika.

Za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin za izolate vrste *S. maltophilia* še ni oblikovanih kriterijev, zato smo zanje z metodo difuzijskega gradienta določili samo MIK. Izolati vrste *S. maltophilia* so odporni proti številnim antibiotikom, in sicer proti večini betalaktamov in aminoglikozidov. Pri 25 testiranih izolatih smo odčitali MIK tigeciklina, ki je bil v razponu od 0,38 µg/mL do 8 µg/mL. MIK₉₀ tigeciklina za testirane izolate je znašal 6 µg/mL in je bil nižji kot pri izolatih vrste *P. aeruginosa*.

Kot smo pričakovali je metoda difuzijskega gradienta natančnejša kot disk difuzijska metoda in zato ustrežnejša za testiranje občutljivosti tigeciklina v mikrobiološkem laboratoriju.

5.2 SKLEPI

- V raziskavi smo z mikrodilucijsko metodo ugotavljali občutljivost 200 najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb, osamljenih pri hospitaliziranih bolnikih v Sloveniji, za novi glicilciklinski antibiotik tigeciklin, ki je tik pred začetkom uporabe v naši državi.
- Med 135 testiranimi izolati bakterijskih vrst *S. aureus*, *S. agalactiae*, rodu *Enterococcus* in enterobakterij, za katere so oblikovani kriteriji za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin, je bilo 134 (99,3 %) občutljivih in en izolat mejno občutljiv za tigeciklin.
- MIK_{90} tigeciklina pri po Gramu pozitivnih bakterijah so bili nižji ($\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$) kot pri po Gramu negativnih bakterijah ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$).
- Tigeciklin je *in vitro* dobro učinkovit proti izolatom *S. aureus*, vključno z MRSA ($MIK_{90} = 0,25 \mu\text{g/mL}$), enterokokov, vključno z VRE ($MIK_{90} = 0,12 \mu\text{g/mL}$), *S. agalactiae* ($MIK_{90} = 0,03 \mu\text{g/mL}$), *S. pneumoniae* ($MIK_{90} = 0,03 \mu\text{g/mL}$), *H. influenzae* ($MIK_{90} = 0,5 \mu\text{g/mL}$) in enterobakterijam, vključno z izolati, ki izločajo ESBL.
- Tigeciklin je *in vitro* slabše učinkovit proti izolatom vrst *A. baumannii* ($MIK_{90} = 1 \mu\text{g/mL}$) in *P. aeruginosa* ($MIK_{90} = 16 \mu\text{g/mL}$).
- Metode, s katerimi določamo MIK, so natančnejše in zato ustrežnejše za rutinsko testiranje občutljivosti tigeciklina v mikrobiološkem laboratoriju kot disk difuzijska metoda.

6 POVZETEK

Eden od glavnih razlogov, ki je močno prispeval k zmanjšanju zapletov zdravljenja bakterijskih okužb in umrljivosti zaradi infekcijskih bolezni, je odkritje antibiotikov. To je pomemben mejnik v razvoju in napredku medicine. Vendar pa se v našem okolju pojavljajo bakterijski izolati, ki so odporni proti posameznim antibiotikom. Številne raziskave kažejo prav na povezanost prekomerne uporabe antibiotikov s pojavom odpornosti. Z odkritjem večkratno odpornih bakterij je problem zdravljenja bakterijskih okužb zelo narasel. Med njimi so najbolj znani proti meticilinu odporni izolati *S. aureus* – MRSA, proti vankomicinu odporni izolati enterokokov – VRE in enterobakterije, ki izločajo laktamaze beta z razširjenim spektrom delovanja – ESBL.

Številni dejavniki okolja prispevajo k širjenju proti antibiotikom odpornih bakterij in ustvarjajo selekcijski pritisk. Pomemben korak za zmanjšanje bakterijske odpornosti in omejitev širjenja okužb je hitro in zgodnje odkrivanje odpornih izolatov ter smotrna uporaba antibiotikov. Antibiotiki so zaradi pojava odpornih izolatov manj učinkoviti in zdravljenje bakterijskih okužb je z njimi vse manj uspešno. Zato je potreba po odkrivanju novih učinkovitih protimikrobnih sredstev velika.

Tigeciklin, ki spada v novo skupino glicilciklinov, je eden izmed zadnjih razvitih antibiotikov in je namenjen za zdravljenje okužb kože, podkožja in zapletenih okužb trebušne votline.

V diplomski nalogi smo z mikrodilucijsko metodo ugotavljali občutljivost 200 izolatov najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb, osamljenih pri hospitaliziranih bolnikih, za tigeciklin, ki je v Sloveniji tik pred začetkom uporabe.

Od 135 izolatov bakterijskih vrst *S. aureus*, *S. agalactiae*, rodu *Enterococcus* in enterobakterij, za katere so oblikovani kriteriji za opredeljevanje občutljivosti za tigeciklin, smo 134 (99,3 %) izolatov opredelili kot občutljive in en izolat kot mejno občutljiv za tigeciklin. Niti en izolat med testiranimi vrstami, za katere so že oblikovani kriteriji občutljivosti, nismo opredelili kot odporen proti tigeciklinu. To nakazuje, da je

zaenkrat večina najpogostejših povzročiteljev bakterijskih okužb dobro občutljiva za tigecklin.

Ugotovili smo, da je tigecklin *in vitro* bolj učinkovit proti po Gramu pozitivnim bakterijskim izolatom, saj so bile $MIK_{90} \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$, kot proti po Gramu negativnim bakterijskim izolatom, za katere so bile $MIK_{90} \geq 0,5 \mu\text{g/mL}$. Poleg tega je bil tigecklin *in vitro* dobro učinkovit tudi proti večkratno odpornim izolatom MRSA (100 % občutljivih), VRE (MIK_{90} je znašal $0,03 \mu\text{g/mL}$) in proti enterobakterijam, ki v zunanje okolje izločajo ESBL, saj je bilo med 8 ESBL pozitivnimi izolati 7 (87,5 %) izolatov opredeljenih kot občutljivi in le en izolat kot mejno občutljiv.

Za izolate vrste *A. baumannii* in *P. aeruginosa* je bil tigecklin *in vitro* slabše učinkovit, saj sta bili vrednosti MIK_{90} visoki, in sicer $1 \mu\text{g/mL}$ oz. $16 \mu\text{g/mL}$.

S testiranjem 67 večkratno odpornih bakterijskih izolatov (MRSA, VRE, *E. coli* in *K. pneumoniae*, ki so izločale ESBL ter *S. maltophilia*) smo želeli primerjati rezultate disk difuzijske metode in metode difuzijskega gradienta za določanje občutljivosti za tigecklin. Ugotovili smo, da je metoda difuzijskega gradienta natančnejša kot disk difuzijska metoda in posledično ustrežnejša za rutinsko testiranje občutljivosti tigecklina v mikrobiološkem laboratoriju.

7 VIRI

Anzueto A., Adams S.G. 2003. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. V: Community-acquired respiratory infections: Antimicrobial management. Nightingale C.H., Ambrose P.G., File T.M. (eds.). San Antonio, Informa Health Care: 215-254

Arthur M., Reynolds P., Courvalin P. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology*, 4, 10: 401-407

Avison M.B. 2005. New approaches to combating antimicrobial drug resistance. *Genome Biology*, 6, 13: 243

Baddour M.M., Abuelkheir M.M., Fatani A.J. 2006. Trends in antibiotic susceptibility patterns and epidemiology of MRSA isolates from several hospitals in Riyadh, Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5: 30-30

Barrow E.W., Dreier J., Reinelt S., Bourne P.C., Barrow W.W. 2007. *In vitro* efficacy of new antifolates against trimethoprim-resistant *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 12: 4447–4452

Beekmann S.E., Heilmann K.P., Richter S.S., Garcia-de-Lomas J., Doern G.V. 2005. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and group A β -haemolytic streptococci in 2002-2003. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 25: 148-156

Bradford P.A. 2001. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 933–951

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2004. Antimicrobial chemotherapy. V: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 23th ed. Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. (eds.). New York, McGraw-Hill Professional: 161-195

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 4: 686-707

Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232-260

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth Informational Supplement, M100-S18. Winkler M.A. (ed.). Wayne, Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute: 181 str.

Enright M.C., Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H., Spratt B.G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11: 7687-7692

Frampton J.E., Curran M.P. 2005. Tigecycline. *Drugs*, 65, 18: 2623-2635

Gill C.J., Abruzzo G.K., Flattery A.M., Misura A.S., Bartizal K., Hickey E.J. 2007. *In vivo* efficacy of a novel oxazolidinone compound in two mouse models of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 9: 3434-3436

Greer N.D. 2006. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycycline class of antibiotics. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, 19, 2: 155-161

Gupta K., MacIntyre A., Vanasse G., Dembry L.M. 2007. Trends in prescribing β -lactam antibiotics for treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 12: 3930-3934

Henwood C.J., Gatward T., Warner M., James D., Stockdale M.W., Spence R.P., Towner K.J., Livermore D.M., Woodford N. 2002. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* in the UK, and *in vitro* evaluation of tigecycline (GAR-936). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 3: 479-487

Jenkins A.J., Valentine J.L. 2003. Antimicrobial drugs. V: Handbook of drug interactions: A clinical and forensic guide. Mozayani A., Raymon L.P. (eds.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 295-318

Kauffman C.A. 2003. Therapeutic and preventative options for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, Suppl. S3: iii23-iii30

MacDougall C., Polk R.E. 2005. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 4: 638-656

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International: 992 str.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall International: 965-993

Martinez J.L., Baquero F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 7: 1771-1777

Milatovic D., Schmitz F.J., Verhoef J., Fluit A.C. 2003. Activities of glycylicline tigecycline (GAR-936) against 1,924 recent european clinical bacterial isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1: 400-404

Muralidharan G., Fruncillo R.J., Micalizzi M., Raible D.G., Troy S.M. 2005. Effects of age and sex on single-dose pharmacokinetics of tigecycline in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4: 1656-1659

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. 2002. Antibacterial agents. V: Medical microbiology. 4th ed. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. (eds.). St. Louis, Mosby: 185-194

Nord C.E., Sillerström E., Wahlund E. 2006. Effect of tigecycline on normal oropharyngeal and intestinal microflora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 10: 3375-3380

Paterson D.L., Bonomo R.A. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 4: 657-686

Perez F., Hujer A.M., Hujer K.M., Decker B.K., Rather P.N., Bonomo R.A. 2007. Minireview: Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 10: 3471-3484

Petinaki E., Guérin-Faubleé V., Pichereau V., Villers C., Achard A., Malbruny B., Leclercq R. 2008. Lincomycin resistance gene *lnu* (D) in *Streptococcus uberis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2: 626-630

Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. Gardner P. 2001. Pharmacology. 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone: 856 str.

Reinert R.R., Low D.E., Rossi F., Zhang X., Wattal C., Dowzicky M.J. 2007. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 5: 1018-1029

Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Tenover F.C. 2001. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, 33, Suppl. 3: S108-S115

Tiwari H.K., Sen M.R. 2006. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infectious Diseases*, 6: 156-156

Townsend M.L., Pound M.W., Drew R.H. 2007. Tigecycline in the treatment of complicated intra-abdominal and complicated skin and skin structure infections. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3, 6: 1059-1070

Tsubery H., Yaakov H., Cohen S., Giterman T., Matityahou A., Fridkin M., Ofek I. 2005. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 49, 8: 3122-3128

Tygacil: Mechanism of action. 2008. Madison, New Jersey, Wyeth Pharmaceuticals Inc. www.wyeth.com/hcp/tygacil/moa (avgust 2008): 1 str.

Waites K.B., Duffy L.B., Dowzicky M.J. 2006. Antimicrobial susceptibility among pathogens collected from hospitalized patients in the United States and in vitro activity of tigecycline, a new glycylicycline antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 10: 3479-3484

Werner G., Gfrörer S., Fleige C., Witte W., Klare I. 2008. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 5: 1182-1183

Zhanel G.G., Homenuik K., Nichol K., Noreddin A., Vercaigne L., Embil J., Gin A., Karlowsky J.A., Hoban D.J. 2004. The glycylicyclines: A comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, 64, 1: 63-88

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med. za strokovno vodenje, svetovanje, vzpodbudne besede in usmerjanje pri izvajanju diplomske naloge ter recenzentki prof. dr. Evi Ružič-Sabljić, dr. med. za natančen in korekten pregled diplomske naloge.

Zahvala je namenjena tudi sodelavkam v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, in sicer Marji, Antoniji, Mrjetki in Poloni za pomoč, nasvete in podporo pri praktični izvedbi diplomske naloge. Še posebej hvala za vse minutke, s katerimi ste mi polepšale dneve.

Še posebej bi se rada zahvalila mojim staršem, bratoma Ivanu in Alešu ter sestri Ireni, ker so mi ves čas stali ob strani, me podpirali in spodbujali pri premagovanju ovir.

Hvala tudi Alešu, ki je verjel vame in me razumel. S tabo je bilo vse lažje.

Zahvaljujem se tudi sošolkam Mojci, Nini, Jasmini, Barbari in vsem prijateljem, ki ste me spremljali in spodbujali skozi čas študija.