

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maruša RAVNIK

**PRIMERJAVA METOD ZA DOKAZOVANJE
KARBAPENEMAZ, KI JIH IZLOČAJO
ENTEROBAKTERIJE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Maruša RAVNIK

**PRIMERJAVA METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ, KI
JIH IZLOČAJO ENTEROBAKTERIJE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**COMPARISON OF METHODS FOR DETECTING
CARBAPENEMASE PRODUCING *Enterobacteriaceae***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani in na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, za somentorico doc. dr. Viktorijo Tomič in za recenzenta prof. dr. Jureta Stojana.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme

Somentorica: doc. dr. Viktorija Tomič

Recenzent: prof. dr. Jure Stojan

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME

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

Članica: doc. dr. Viktorija TOMIČ

Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo

Recenzent: prof. dr. Jure STOJAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maruša Ravnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 579.61:616.078:615.33:577.2.083(043)=163.6
KG enterobakterije/encimi/odpornost proti antibiotikom/karbapenemi/karbapenemaze/
beta-laktamaze
AV RAVNIK, Maruša, dipl. mikrobiol (UN)
SA SEME, Katja (mentorica)/TOMIČ, Viktorija (somentorica)/STOJAN, Jure
(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2014
IN PRIMERJAVA METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ, KI JIH
IZLOČAJO ENTEROBAKTERIJE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 56 str., 16 pregl., 14 sl., 1 pril., 41 vir.
IJ sl
JI sl/en
AB Karbapenemaze so beta-laktamaze, ki hidrolizirajo peniciline, večino cefalosporinov, karbapeneme in monobaktame. Geni za karbapenemaze se najpogosteje nahajajo na mobilnih genetskih elementih, kar jim omogoča hitro in enostavno širjenje med različnimi bakterijskimi vrstami. V zadnjih letih se število enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze vedno bolj povečuje. Ker so enterobakterije pogosti povzročitelji bolnišničnih okužb, širjenje odpornosti proti karbapenemom pomeni velik problem. Zaradi tega je nadzor nad bakterijami, ki izločajo karbapenemaze v zdravstvenih ustanovah izrednega pomena. Da bi določili najboljšo metodo za dokaz karbapenemaz pri enterobakterijah, smo med seboj primerjali različne metode, ki jih priporočajo evropski (EUCAST) in ameriški (CLSI) laboratorijski standardi. Razdelili smo jih na presejalne (disk difuzijski antibiogram, kultivacija na kromogenem agarju ESBL, kultivacija na kromogenem agarju za dokazovanje prisotnosti enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze, določitev minimalnih inhibitornih koncentracij za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradienta) in potrditvene (modificiran test Hodge, Carba NP, metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz, PCR). Med 49 testiranimi izolati enterobakterij, smo pri 10 z dokazom genov za karbapenemaze iz družin KPC, VIM, NDM-1 in OXA-48 potrdili karbapenemazno aktivnost. S presejalnima metodama, kot sta disk difuzijski antibiogram ali določitev minimalne inhibitorne koncentracije karbapenemov smo lahko izločili izolate, ki ne izločajo karbapenemaz. Med potrditvenimi metodami sta bili najbolj uporabni Carba NP s 100 % specifičnostjo in občutljivostjo ter metoda kombiniranih diskov za potrditev prisotnosti karbapenemaz s 100 % specifičnostjo in 70 % občutljivostjo. Na osnovi rezultatov opravljene raziskave, lahko zaključimo, da je za mikrobiološke laboratorije, ki ne izvajajo rutinskih PCR analiz za dokaz genov za karbapenemaze, najhitrejši, najbolj občutljiv, specifičen in cenovno ugoden test Carba NP.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.61:616.078:615.33:577.2.083(043)=163.6
CX *Enterobacteriaceae*/enzyme/antimicrobial resistance/carbapenems/carbapenemases/
beta-lactamases
AU RAVNIK, Maruša
AA SEME, Katja (supervisor)/TOMIČ, Viktorija (co-advisor)/STOJAN, Jure
(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI COMPARISON OF METHODS FOR DETECTING CARBAPENEMASE
PRODUCING *Enterobacteriaceae*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 56 p., 16 tab., 14 fig., 1 app., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Carbapenemases are beta lactamases that hydrolyze penicillins, most cephalosporins, and to varying degrees carbapenems and monobactams. Genes for carbapenemases are mostly encoded on mobile genetics elements which enable them rapid and easy spread among different bacterial species. In last few years the dissemination of carbapenemes caused outbreaks in several countries around the world. *Enterobacteriaceae* are common cause of nosocomial infections and resistance to carbapenemes become a big problem for medicine. Because of that the detection and control of carbapenemase is very important. We compared different methods for detecting carbapenemases recommended by European (EUCAST) and American (CLSI) laboratory standards to determine the optimal for use in routine microbiology laboratory. Screening (disc diffusion – basic antibiogram, cultivation on chromogenic ESBL agar, cultivation on chromogenic agar for detecting carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, determination of minimal inhibitory concentration with agar diffusion method) and confirmatory methods (Modified Hodge test, Carba NP, combinatory disc diffusion test for confirmation of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*, PCR) were used. In 10 out of 49 tested isolates carbapenemase genes from the carbapenemase families KPC, VIM, NDM-1 and OXA-48 were confirmed. Using screening methods (disc diffusion and determination of carbapenem minimal inhibitory concentration) isolates without carbapenemase production could be excluded. Most useful among confirmatory methods were Carba NP test with 100 % specificity and sensitivity and combinatory disc diffusion test with 100 % specificity and 70 % sensitivity. According to the results of our study we can conclude that the fastest, most sensitive, specific and inexpensive confirmatory method is Carba NP followed by combinatory disc diffusion method. Carba NP is the most appropriate method for routine microbiology laboratories which do not perform PCR for detection of carbapenemase genes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEYWORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ENTEROBAKTERIJE	3
2.2 BETA-LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI.....	4
2.2.1 Karbapenemi.....	5
2.2 BETA-LAKTAMAZE.....	7
2.2.1 Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL)	10
2.2.2 Beta laktamaze AmpC	11
2.3 KARBAPENEMAZE	12
2.3.1 Karbapenemaze iz razreda A	12
2.3.2 Karbapenemaze iz razreda B	14
2.3.3 Karbapenemaze iz razreda D	18
2.3.4 Zdravljenje	20
2.3.5 Razširjenost CPE (ang. Carbapenemase producing enterobacteria) v Evropi	22
2.3.6 Metode za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz	23
3 MATERIALI IN METODE	25
3.1 IZOLATI	25
3.1.1 Recepti za pripravo uporabljenih gojišč	26
3.2 PRESEJALNE METODE ZA DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI KARBAPENEMAZ PRI ENTEROBAKTERIJAH.....	26
3.2.1 Disk difuzijski antibiogram – osnovni antibiogram	26
3.2.2 Kultivacija na kromogenem gojišču ESBL	28

3.2.3	Kultivacija na kromogenem CRE gojišču za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze.....	29
3.2.4	Določevanje MIK za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradient	30
3.3	POTRDITVENE METODE ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ, KI JIH IZLOČAJO ENTEROBAKTERIJE	32
3.3.1	Določanje genov za karbapenemaze z verižno reakcijo s polimerazo	32
3.3.2	Modificiran test Hodge.....	34
3.3.3	Metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz	35
3.3.4	Test Carba NP.....	37
3.4	SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ	38
4	REZULTATI.....	40
4.1	DOLOČANJE GENOV ZA KARBAPENEMAZE Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMEZARO	40
4.2	OSNOVNI ANTIBIOGRAM	40
4.3	KULTIVACIJA NA KROMOGENEM ESB� AGARJU IN AGARJU ZA DOKAZOVANJE ENTEROBAKTERIJ, KI IZLOČAJO KARBAPENEMAZE	41
4.4	DOLOČITEV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ZA IMIPENEM, ETRAPENEM IN MEROPENEM Z METODO DIFUZIJSKEGA GRADIENTA.....	42
4.5	MODIFICIRAN TEST HODGE	44
4.6	METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRJEVANJE KARBAPENEMAZ	44
4.7	TEST Carba NP	45
4.8	MEHANIZEM ODPORNOSTI ZA VSAK IZOLAT	45
4.9	SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ.....	45
5	RAZPRAVA.....	47
6	SKLEPI	51
7	POVZETEK.....	52
8	VIRI	53
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacijska shema bakterijskih beta-laktamaz (Bush in Jacoby, 2010).	8
Preglednica 2: Podskupine OXA beta-laktamaz z karbapenemazno aktivnostjo (Rao, 2012).....	19
Preglednica 3: Primerjava smernic za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz, ki jih določata EUCAST in CLSI (EUCAST, 2014; CLSI 2013).	24
Preglednica 4: Primerjava interpretacijskih kriterijev EUCAST (2014) in CLSI (2013) za opredeljevanje občutljivosti karbapenemov na osnovi izmerjenih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK).	31
Preglednica 5: Količine reagentov za izvedbo PCR (25 µl reakcija).....	33
Preglednica 6: Pogoji pomnoževanja DNA, odvisno od tarčnega mesta pomnoževanja. .	33
Preglednica 7: Rezultati dokazovanja genov za karbapenemaze z metodo PCR.	40
Preglednica 8: Občutljivost izolatov proti karbapenemom pri disk difuzijski metodi.	40
Preglednica 9: Rezultati kultivacije na kromogenih gojiščih ESBL in CRE.....	41
Preglednica 10: Občutljivost izolatov za karbapeneme, glede na izmerjene MIK interpretirane po smernicah CLSI (2013).....	42
Preglednica 11: Občutljivost izolatov za karbapeneme, glede na izmerjene MIK interpretirane po smernicah EUCAST (2014).....	43
Preglednica 12: Rezultati MHT testa.....	44
Preglednica 13: Končni rezultat metode kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz	44
Preglednica 14: Rezultati metode Carba NP	45
Preglednica 15: Mehanizmi odpornosti testiranih izolatov, določeni glede na presejalne in potrditvene metode.	45
Preglednica 16: Izračunana specifičnost in občutljivost za metode, ki se lahko uporabljajo za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz.	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Olivanična kislina (levo) in tienamicin (desno) (Papp-Wallace in sod., 2011).....	5
Slika 2: Glavne razlike med penicilini, cefalosporini in karbapenemi (zgoraj); mesto, na katerem se nahaja hidroksietilna skupina pri karbapenemih (spodaj) (Papp-Wallace in sod., 2011).....	6
Slika 3: Delovanje beta-laktamaze na beta-laktamski antibiotik (Zeba, 2005)	8
Slika 4: Geografska razporeditev encimov KPC po svetu (Walsh, 2010).....	14
Slika 5: Razširjenost metalo beta-laktamaz po svetu (Walsh, 2010).....	17
Slika 6: Globalna razširjenost karbapenemaz OXA (Walsh, 2010).	20
Slika 7: Razširjenost CPE v 39 evropskih državah (Glasner in sod., 2013).....	23
Slika 8: Disk difuzijski antibiogram za imipenem (IPM10), ertapenem (ETP10) in meropenem (MEM10) (izolat <i>K. pneumoniae</i> , ki izloča KPC).....	28
Slika 9: Rast na kromogenem ESBL agarju (izolat <i>K. pneumonia</i>)	29
Slika 10: Rast na kromogenem agarju za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze (Oxoid, 2014).....	30
Slika 11: Določitev MIK za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradienta (izolat <i>K. pneumonia</i> , ki izloča KPC).....	31
Slika 12: Rezultat MHT testa (Amjad in sod., 2011)	35
Slika 13: Metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz (izolat <i>K. pneumoniae</i> , ki izloča KPC).....	37
Slika 14: Rezultati testa Carba NP.....	38

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIM-1	Australian imipenemase
AM	Ampicilin
AMC	Amoksisicilin + klavulanska kislina
AN	Amikacin
APBA	Aminophenylboronic acid
ARI-1	Acinetobacter resistant to imipenem
ATM	Aztreonam
BCI/BCII	<i>Bacillus cereus</i> metallo- β -lactamase
BlaB/GOB-1	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> metallo- β -lactamase
CAZ	Ceftazidim
CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i> metallo- β -lactamase
CFM	Cefiksim
CIP	Ciprofloksacin
CLA	Klavulanska kislina
CPE	carbapenemase producing <i>Enterobacteriaceae</i>
CphA	<i>Aeromonas</i> spp. metallo- β -lactamase
CTX	Cefotaksim
CX	Cloxacillin
CXM	Cefuroksim
CZ	Cefazolin
DIM-1	Dutch imipenemase
DIP	Dipikolinična kislina
DPA	Dipicolinic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/etilendiamintetraocetna kislina
ESBL	Extended spectrum beta lactamases
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepim
FEZ-1	<i>Legionella gormannii</i> metallo- β -lactamase
FIM-1	Florence imipenemase
FN	False negative
FOX	Cefoksitin
FP	False positive
GES	Guiana extended spectrum
GIM	German imipenemase
GM	Gentamicin
IMI	Imipenem hydrolizing β -lactamase
IMP	Active in imipenem
IPM	Imipenem
IND-1	<i>Chryseobacterium indologenes</i> metallo- β -lactamase

JOHN-1	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> metallo- β -lactamase
KHM-1	Kyorin Health Science metallo- β -lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumonia</i> carbapenemase
KRBaza	Karbapenemaza
L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> metallo- β -lactamase
MBL	Metalo beta-laktamaza
Mbl1B	<i>Caulobacter crescentus</i> metallo- β -lactamase
MEM	Meropenem
MHT	Modificiran Hodge test
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MRPBO	Meropenem + boronična kislina
MRPCX	Meropenem + kloksacilin
MRPDP	Meropenem + dipikolinski kislina
MUS-1	<i>Myroides spp.</i> metallo- β -lactamase
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase
NET	Netilmicin
NMC	Not metalloenzyme carbapenemase
OMP	Outer membrane protein
OXA	Oxacillin hydrolizing
PCR	Polymerase chain reaction
PBA	Phenylboronic acid
PBP	Penicillin binding protein
SHV	Sulphydryl variable
SIM	Seoul imipenemase
SFH-1	<i>Serratia fonticola</i> metallo- β -lactamase
SMB-1	<i>Serratia marcescens</i> metallo- β -lactamase
SME	<i>Serratia masrcescens</i> carbapenemase
SPM	Sao Paolo metallo- β -lactamase
SXT	Trimetoprim + sulfometoksazol
TEM	Temoniera melato- β laktamaza
THIN-B	<i>Janthinobacterium lividum</i> metallo- β -lactamase
TN	True negative
TMB-1	Tripoli metallo- β -lactamase
TP	True positive
TUS-1	<i>Myroides spp.</i> metallo- β -lactamase
TZB	Tazobaktam
TZP	Piperacilin + tazobaktam
VIM	Verona integron encoded metallo- β -lactamase

1 UVOD

Enterobakterije so lahko del normalne flore, lahko pa so tudi patogeni in povzročajo različne zunajbolnišnične in bolnišnično pridobljene okužbe. Zanje je značilno, da so nagnjene k pridobivanju genetskega materiala s horizontalnim genetskim prenosom, kar je razlog zakaj je spremljanje pojava večkratno odpornih bakterij iz družine *Enterobacteriaceae* tako velikega pomena za klinično zdravljenje (Nordmann in sod., 2012a).

Karbapenemaze so encimi, ki spadajo med beta-laktamaze in omogočajo hidrolizo karbapenemskih antibiotikov. Gene, ki vsebujejo zapis za encime, bakterije nosijo bodisi na kromosomu, bodisi na plazmidih. Glede na aminokislinsko zaporedje jih uvrščamo v 3 razrede, znotraj teh pa jih delimo v družine. V Amblerjev razred A spadajo karbapenemaze KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza) ki hidrolizirajo vse beta-laktamske antibiotike. V Amblerjev razred B spadajo metalo beta-karbapenemaze, kamor sodijo encimi z največjo karbapenemazno aktivnostjo. Delujejo proti vsem penicilinom, cefalosporinom in karbapenemom. Encimi Amblerjevega razreda D so večinoma OXA-48 in OXA-181 in so značilni predvsem za bakterijo *Klebsiella pneumoniae* (Nordmann in sod., 2012b; Livermore, 2012).

Okužbe, ki jih povzročajo enterobakterije, odporne proti karbapenemom imajo omejeno možnost zdravljenja in so povezane z večjo stopnjo smrtnosti. Zato je predvsem za zdravstvene ustanove pomembno vedenje, kako pogosto se pojavljajo proti karbapenomom odporne enterobakterije. S tem, ko se spregleda prvi pojav tovrstnih bakterij, se lahko zamudi priložnost hitrega ukrepanja in možnost preprečitve širjenja le-teh (Gupta in sod., 2011).

Na voljo so številni testi, ki omogočajo odkrivanje proti karbapenemom odpornih bakterij, vendar jih je veliko slabo občutljivih in specifičnih, dolgotrajnih, težko izvedljivih, cenovno nedostopnih ali slabo prilagodljivih za klinične potrebe. V primeru pojava takšnih bakterij, pa je izbira prave metode, ki bo v kratkem času dala zanesljive rezultate ključnega pomena (Gupta in sod., 2011).

1.1 NAMEN

Namen naloge je bil med seboj primerjati različne metode za ugotavljanje prisotnosti karbapenemaz in določiti tisto, ki bo čim bolj specifična, občutljiva, enostavna za izvedbo, cenovno ugodna in s katero bomo lahko v kratkem času določili prisotnost in tip karbapenemaze.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Med izbranimi metodami bomo našli eno metodo ali kombinacijo metod, ki bo visoko občutljiva in specifična za ugotavljanje karbapenemaz pri enterobakterijah.
- Metoda oz. kombinacija metod bo dovolj enostavna in cenovno sprejemljiva za uporabo v slovenskih diagnostičnih mikrobioloških laboratorijih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ENTEROBAKTERIJE

Družina *Enterobacteriaceae* zajema veliko skupino bakterijskih vrst, ki imajo nekatere skupne značilnosti. Večina vrst iz te skupine je prisotnih v človeškem in živalskem črevesu, po čemer so dobile tudi ime. Vse so aerobni in fakultativno anaerobni po Gramu negativni bacili, ki ne izdelujejo spor. Fermentirajo glukozo, reducirajo nitrato v nitrite, imajo encim katalazo, nimajo pa encima oksidaze. Poznanih je okoli 50 rodov in več kot 100 vrst enterobakterij. Nahajajo se v zemlji, vodi, na rastlinah, lahko so predstavniki normalne črevesne flore pri ljudeh in živalih. Med seboj se razlikujejo glede na okolje kjer živijo, v patogenosti in epidemiologiji (Andlovic, 2002).

Med klinično pomembnimi enterobakterijami ločimo patogene vrste, iz rodov *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, ki po okužbi skoraj vedno povzročijo bolezen ter oportunistične patogene bakterije iz rodov *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, ki bolezen povzročajo v posebnih okoliščinah. Sevi iz rodov *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* in *Serratia* so znani predvsem kot povzročitelji bolnišničnih okužb. V zadnjih letih se med njimi pojavljajo sevi z novimi mehanizmi odpornosti proti antibiotikom, zato postaja zdravljenje okužb ki jih povzročajo zelo omejeno (Andlovic, 2002; Livermore, 2012).

Pojav odpornosti proti antibiotikom obstaja že od samega začetka njihove uporabe za zdravljenje bakterijskih okužb. Razlog za to je največkrat množična in nekritična uporaba antibiotikov. Do leta 1980 se je zdelo, da so okužbe s po Gramu negativnimi bakterijami uspešno nadzorovane z cefalosporini, fluorokinoloni in karbapenemi. Od takrat naprej so se bakterije uspešno začele boriti proti njim z razvojem različnih mehanizmov odpornosti, ki so se tekom let uspešno razširili po celem svetu (Seme, 2002; Livermore, 2012).

Po Gramu negativne bakterije so same po sebi bolj dovzetne za odpornost proti protimikrobnim snovem. Razlog za to se skriva v njihovi zgradbi celice. V nasprotju s po Gramu pozitivnimi bakterijami, imajo dve dodatni plasti, ki navzven obdajata peptidoglikan. Prva je zunanja membrana, ki prepreči večjim ali hidrofobnim molekulam vstop v celico, tistim, ki skozi membrano še lahko prehajajo pa prehod upočasni. Drugo plast predstavlja periplazemski prostor, to je vmesni prostor med peptidoglikanom in zunanjo membrano, kjer je prisotna druga stopnja obrambe (npr. beta-laktamaze, proteinske črpalke). Onemogočeno delovanje antibiotikov je lahko posledica naravne ali pridobljene bakterijske odpornosti. Naravna odpornost pomeni, da je vsa bakterijska vrsta odporna proti določeni skupini antibiotikov. Bakterijska vrsta je naravno odporna, kadar bakterije nimajo tarčnih mest, na katera antibiotiki delujejo ali pa sestava celične stene

onemogoča prehod antibiotika v celico. Pridobljeno odpornost imajo samo nekateri sevi znotraj bakterijske vrste. Ta je lahko posledica različnih mutacij kromosomskega ali plazmidnega gena ali pa pridobitev nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice (npr. s konjugacijo ali transformacijo). Poznanih je pet glavnih mehanizmov pridobljene bakterijske odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002; Livermore, 2012).

Glavni mehanizmi pridobljene odpornosti:

- Sprememba tarčnega mesta ali prijemališča antibiotika (sprememba zgradbe penicilin vezočih proteinov - PBP).
- Razgradnja antibiotika z specifičnimi encimi (razgradnja beta-laktamov z beta-laktamazami).
- Zmanjšana prepustnost ali neprepustnost celične membrane (zmanjšana prepustnost beta-laktamov pri po Gramu negativnih bakterijah zaradi spremembe zgradbe porinov v celični steni).
- Sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik (alternativna pot tisti, ki jo protimikrobna učinkovina onemogoča).
- Aktivno črpanje antibiotika z aktivnim prenosom iz bakterijske celice (proteinske črpalke) (Seme, 2002; Livermore, 2012).

Mehanizem rezistence proti karbapenemom vključuje produkcijo beta-laktamaz in proteinskih črpalk ter mutacije, ki spremenijo izražanje in/ali funkcijo porinov in PBP proteinov. Kombinacija teh mehanizmov omogoča visoke stopnje odpornosti proti karbapenemom pri določeni bakterijski vrsti, kot je npr. *Klebsiella pneumoniae* (Papp-Wallace in sod., 2011).

2.2 BETA-LAKTAMSKI ANTIBIOTIKI

Za vse beta-laktamske antibiotike je značilno, da imajo v svoji zgradbi beta-laktamski obroč. Delujejo tako, da preprečijo sintezo bakterijske celične stene. Vežejo se na bakterijske encime – peptidaze in transpeptidaze, ki imajo pomembno vlogo pri uvrščanju N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamina v peptidoglikansko verigo. Zato se ti encimi imenujejo tudi penicilin vezoči proteini ali encimi (PBP). Ob vezavi beta-laktama na te proteine, pride do kopičenja osnovnih gradnikov peptidoglikana v bakterijski celici, kar sproži bakterijski avtolitični sistem, ki bakterijsko celico razkroji (Kotnik, 2002).

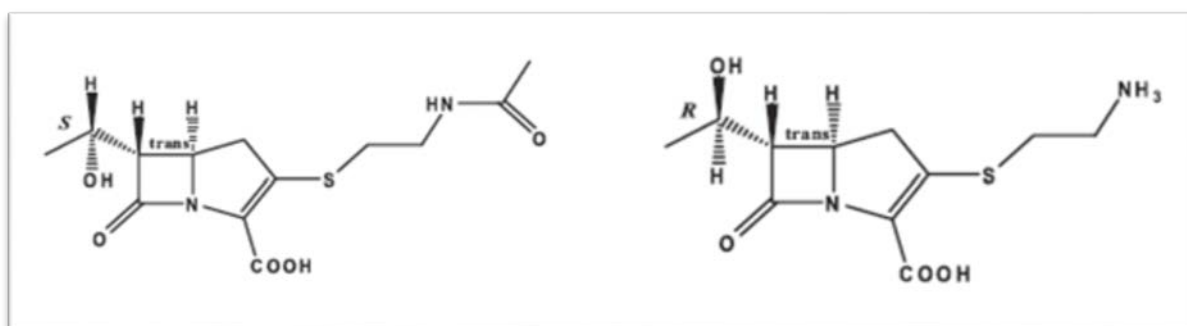
Med beta-laktamske antibiotike spadajo: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami ter inhibitorji beta-laktamaz. Inhibitorji (klavulanska kislina, sulbaktam, tazobaktam) delujejo tako, da se vežejo z beta-laktamazami in s tem preprečijo njihovo

aktivnost. Sami nimajo učinka proti bakterijam, v kombinaciji z antibiotikom pa so lahko učinkoviti (Kotnik, 2002).

2.2.1 Karbapenemi

Karbapenemi so beta-laktamski antibiotiki, ki imajo med vsemi beta-laktami najširši spekter delovanja. Uporablja se jih kot zadnje izbiro zdravljenja bakterijskih okužb – ko drugi antibiotiki ne učinkujejo več. Ker se v zadnjih letih odpornost proti karbapenemom povečuje, je s tem ogroženo njihovo delovanje (Papp-Wallace in sod., 2011).

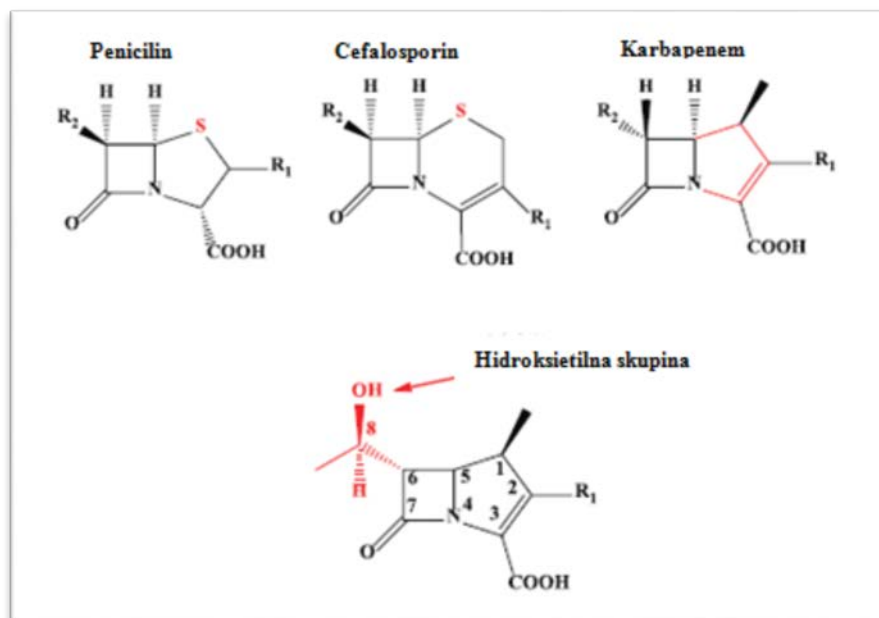
Ko so leta 1960 odkrili prvo beta-laktamazo, so raziskovalci pospešeno začeli iskati njihove inhibitorje. Leta 1976 so odkrili prvega, to je olivanična kislina (slika 1), ki jo proizvaja po Gramu pozitivna bakterija *Streptomyces clavuligerus*. Zanj je značilno »karbapenemsko ogrodje«, ki je osnova vsem karbapenemom. Slabosti sta bili slabo prodiranje preko bakterijske celične stene in kemična nestabilnost. V nadaljevanju so odkrili tienamicin (slika 1), ki ga proizvaja *Streptomyces cattleya*. Spojina velja za prvi karbapenem in predstavlja osnovni model za kemijsko sintezo vseh ostalih. Tudi zanj je značilna kemična nestabilnost, zato je bilo potrebno najti analoge, ki to lastnost imajo. Leta 1985 so odkrili imipenem, ki je postal prvi karbapenem, dostopen za zdravljenje kompleksnih bakterijskih okužb, kmalu za njim še panipenem. Njuni značilnosti sta visoka afiniteta za proteine PBP in stabilnost ob delovanju beta-laktamaz. Pomanjkljivost je bila občutljivost in deaktivacija s strani encima dehidropeptidaze-I, ki se nahaja v tkivu ledvic. Zato so ta dva karbapenema za zdravljenje uporabljali v kombinaciji z cilastatinom ali betamipronom. Največji napredek pri sintezi karbapenemov je bil dodatek metilne skupine na 1- β pozicijo, s katero so antibiotiki postali odporni na delovanje dehidropeptidaze-I (Papp-Wallace in sod., 2011; Rao, 2012).



Slika 1: Olivanična kislina (levo) in tienamicin (desno) (Papp-Wallace in sod., 2011).

Zgradba karbapenemov je podobna penicilinom (slika 2). Osnovno ogrodje predstavlja beta-laktamski obroč, kjer je glavna razlika zamenjava žveplovega atoma z ogljikom na mestu C1. Za odpornost proti beta-laktamazam imata pomembno vlogo hidroksiletalna

skupina, ki se nahaja na mestu C6 ter sama konfiguracija spojine. Karbapenemi se med seboj razlikujejo v sestavi radikalov na mestih R1 in R2. Vse lastnosti skupaj pa pripomorejo, da so ti antibiotiki bolj stabilni in uspešnejši kot penicilini in cefalosporini (Papp-Wallace in sod., 2011).



Slika 2: Glavne razlike med penicilini, cefalosporini in karbapenemi (zgoraj); mesto, na katerem se nahaja hidroksietilna skupina pri karbapenemih (spodaj) (Papp-Wallace in sod., 2011).

Karbapenemi v bakterijsko celico vstopijo preko proteinov OMP (ang.: outer membrane proteins), ki so znani tudi kot porini. Po vstopu v celico, se vežejo na proteine PBP in jih trajno acilirajo. Glavni razlog za učinkovitost karbapenemov je njihova sposobnost vezave na številne različne proteine PBP (Papp-Wallace in sod., 2011).

Karbapenemi, ki se lahko uporabljajo za zdravljenje okužb so: imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, panipenem/betamipron in biapenem. Na splošno velja, da so imipenem, panipenem in doripenem bolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam, medtem ko so meropenem, biapenem in ertapenem bolj učinkoviti proti po Gramu negativnim bakterijam. Karbapeneme dajemo intravenozno, imipenem/cilastatin in ertapenem lahko tudi intramuskularno (Rao, 2012; Papp-Wallace in sod., 2011).

Za karbapeneme veljajo naslednje lastnosti:

- Ertapenem ima ožji spekter delovanja, ker proti bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* ni enako učinkovit, kot sta imipenem ali meropenem.
- Meropenem je proti bakteriji *Acinetobacter baumannii* manj učinkovit kot sta imipenem ali doripenem.

- Doripenem ima manjšo minimalno inhibitorno koncentracijo pri bakterijah *P. aeruginosa* in *A. baumannii* kot jo imata imipenem in meropenem. Poleg tega je najbolj odporen proti hidrolizi s strani karbapenemaz.
- Med vsemi karbapenemi imata imipenem in meropenem najširši spekter delovanja (Papp-Wallace in sod., 2011).

Bakterijska odpornost proti karbapenemom je lahko posledica:

- Produkcije karbapenemaz.
- Aktivnega črpanja karbapenemov iz bakterijske celice (proteinske črpalke).
- Mutacij in sprememb v izražanju in/ali funkciji porinov in PBP.
- Prekomernega izražanja beta-laktamaz AmpC (CMY-10 in PDP) ali beta-laktamaz razširjenega spektra (ang. Extended spectrum beta lactamase – ESBL) (TEM, SHV, CTX-M) v kombinaciji z izgubo porinov (Rao, 2012).

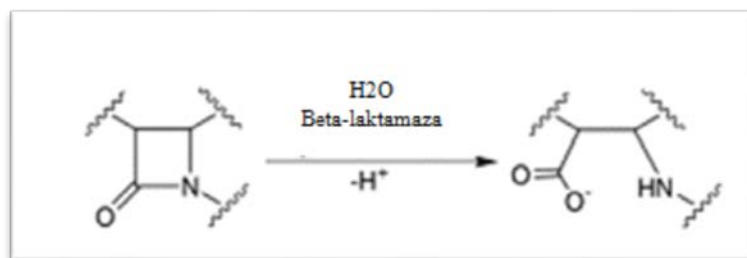
Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je odpornost proti karbapenemom rezultat substitucij aminokisliskega zaporedja v proteinih PBP ali sprememb/produkcije novih proteinov PBP, na katere se karbapenemi ne morejo vezati. Pri po Gramu negativnih bakterijah do odpornosti pride zaradi produkcije beta-laktamaz, aktivnega črpanja karbapenemov iz celice, izgube porinov ali sprememb v proteinih PBP (Rao, 2012).

2.3 BETA-LAKTAMAZE

Hidroliza beta-laktamskih antibiotikov z beta-laktamazami je najpogostejši mehanizem odpornosti klinično pomembnih po Gramu negativnih bakterij. Ker penicilini, cefalosporini in karbapenemi predstavljajo glavno izbiro zdravljenja različnih okužb, je poznavanje prisotnosti in značilnosti teh encimov ključnega pomena pri izbiri ustrezne terapije. Beta-laktamaze predstavljajo najpogostejši mehanizem odpornosti proti antibiotikom. Ti periplazemski encimi hidrolizirajo beta-laktamske antibiotike in jim tako preprečijo dostop do proteinov PBP. Danes je znanih več kot 1000 beta-laktamaz. Večina klinično pomembnih spada med ESBL, beta-laktamaze AmpC, KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) in MBL (ang. Metallo- β -lactamases) (Zeba, 2005; Bush in Jacoby, 2010).

Beta-laktamaze je prvič opisal Abraham s sod. leta 1940 kot bakterijske encime, ki lahko razgradijo penicilin. Danes je znano, da jih izdelujejo številne po Gramu negativne in nekatere po Gramu pozitivne bakterije. So rezultat genetskih transformacij in konformacijskih sprememb proteinov PBP. Bakterijam omogočajo odpornost proti beta-laktamskim antibiotikom, tako da cepijo amidno vez v beta-laktamskem obroču, kot prikazuje slika 3. Gre za številne raznolike encime, ki jih kodirajo kromosomski ali

plazmidni geni. Med seboj se razlikujejo glede na substrat, na katerega delujejo ter po fizikalno-kemičnih lastnostih (Seme, 2002; Zeba, 2005).



Slika 3: Delovanje beta-laktamaze na beta-laktamski antibiotik (Zeba, 2005)

Danes sta v uporabi dve klasifikacijski shemi za delitev beta-laktamaz. Molekularno klasifikacijo je leta 1980 uvedel R. P. Ambler. Temelji na aminokislinskem zaporedju in deli beta-laktamaze v štiri razrede (A-D). Razredi A, C in D za hidrolizo beta-laktama uporabljajo serin, medtem ko v razred B spadajo encimi, ki za hidrolizo uporabljajo divalentne cinkove ione (Ambler, 1980).

Leta 1995 je Bush s sod. predlagal še funkcionalno klasifikacijo, ki upošteva encimske substrate in inhibitorje, ter jih razvršča glede na klinično vlogo v 4 skupine (1-4) (Bush in sod., 1995). V preglednici 1 je prikazana podrobna razvrstitev beta-laktamaz v glavne funkcionalne skupine in podskupine.

Preglednica 1: Klasifikacijska shema bakterijskih beta-laktamaz (CA = klavulanska kislina, TZB = tazobaktam, EDTA = etilendiamintetraocetna kislina, / = ni ustreznega inhibitorja) (Bush in Jacoby, 2010).

Funkcionalna skupina	Molekularna skupina	Substrati	Inhibitorji CA/TZB/EDTA	Značilnosti	Skupine encimov
1	C	Cefalosporini	/	Večja aktivnost proti cefalosporinom kot benzilpenicilinom, hidroliza cefamicinov	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporini	/	Povečana hidroliza ceftazidima in ostalih oksimino beta-laktamov	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilini	CA/TZB	Močnejša hidroliza benzilopenicilinov kot cefalosporinov	PC1
2b	A	Penicilinaze, zgodnji cefalosporini	CA/TZB	Podobna hidroliza benzilpenicilinov in cefalosporinov	TEM-1, TEM-2, SHV-1

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice: Klasifikacijska shema bakterijskih beta-laktamaz (CA = klavulanska kislina, TZB = tazobaktam, EDTA = etilendiamintetraocetna kislina, / = ni ustreznega inhibitorja) (Bush in Jacoby, 2010).

Funkcionalna skupina	Molekularna skupina	Substrati	Inhibitorji CA/TZB/EDTA	Značilnosti	Skupine encimov
2be	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja, monobaktami	CA/TZB	Povečana hidroliza oksimino beta-laktamov	TEM3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilini	/	Odpornost proti klavulanski kislini in tazobaktamu	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja, monobaktami	/	Povečana hidroliza oksimino beta-laktamov, odpornost proti klavulanski kislini, sulbaktamu in tazobaktamu	TEM-50
2c	A	Karbenicilin	CA/TZB	Povečana hidroliza karbenicilinov	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenicilin, cefepim	CA/TZB	Povečana hidroliza karbenicilinov, cefepima in cefpiroma	RTG-4
2d	D	Kloksacilin	CA/TZB/EDTA	Povečana hidroliza kloksacilina ali oksacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja	CA/TZB	Hidroliza kloksacilina ali oksacilina in oksimino beta-laktamov	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemi	CA/TZB	Hidroliza kloksacilina ali oksacilina in karbapenemov	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporini z razširjenim spektrom delovanja	CA/TZB	Hidroliza cefalosporinov. Inhibicija z klavulanatom, ne z aztreonamom	CepA
2f	A	Karbapenemi	CA/TZB	Povečana hidroliza karbapenemov, cefamicinov, oksimino-β-laktamov	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Karbapenemi	EDTA	Hidroliza antibiotikov z širokim spektrom delovanja, karbapenemov, občutljivost za aztreonam	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B (B3)	Karbapenemi	EDTA	Preferenčna hidroliza karbapenemov	L-1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	B (B2)				CphA, Sfh-1

Skupina 1 zajema encime cefalosporinaze, ki spadajo v molekularni razred C. Zapisi zanje se nahajajo na kromosomu številnih enterobakterij in nekaterih drugih organizmov. So bolj odporni proti cefalosporinom (cefalotin, cefaloridin, cefaleksin) kot proti benzilpenicilinu. Klavulanska kislina jih ne inhibira, nanje pa ne delujejo niti aztreonam in cefamicini, kot je npr. cefoksitin. Glavni predstavniki te skupine so beta-laktamaze AmpC (Bush in Jacoby, 2010; Jacoby, 2009).

Skupina 2 je največja skupina beta-laktamaz in vključuje encime, ki spadajo v molekularna razreda A in D. Znotraj te skupine obstajajo številne podskupine, ki encime ločijo glede na substrat, na katerega delujejo encimi in inhibitorje, ki preprečijo njihovo aktivnost. Ti preferenčno hidrolizirajo benzilpenicilin in številne derivate penicilina, šibko pa cefalosporine, karbapeneme in monobaktame. V razredu A so najpogostejše beta-laktamaze iz skupin TEM (ime izhaja iz priimka bolnika - Temoniera, pri katerem so encim leta 1960 prvič dokazali) in SHV (ang. sulphhydryl variable). Ob nesmotrni uporabi antibiotikov je v prvotnih encimih prihajalo do mutacij, kar je povzročilo nastanek več kot 100 različic encimov TEM in več kot 20 različic encimov SHV. Večina teh variant ima visoko katalitično aktivnost in širok spekter delovanja, zato so ti encimi poimenovani kot ESBL. V D razred spadajo OXA-serin hidrolaze (oksacilin hidrolizirajoče). Obstaja vsaj 30 različic encima, med katerimi imajo nekateri razširjen spekter delovanja (Zeba, 2005; Bush in Jacoby, 2010).

V skupino 3 spadajo metalo beta-laktamaze, ki so uvrščene v molekularni razred B. Od ostalih se razlikujejo po strukturi in funkciji. Za delovanje potrebujejo v aktivnem mestu encima cinkova iona namesto serina. Bakterijam omogočajo odpornost proti vsem beta-laktamskim antibiotikom. Niso občutljivi za klavulansko kislino ali tazobaktam. Nanje delujejo inhibitorji, kot so EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), dipikolonična kislina in 1,10-o-fenantrolin (Zeba, 2005; Bush in Jacoby, 2010).

Skupina 4 zajema beta-laktamaze, ki jih zaenkrat ne morejo uvrstiti v noben molekularni razred, so pa odporne na delovanje klavulanske kisline (Bush in Jacoby, 2010).

2.3.1 Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL)

ESBL so definirane kot prenosljivi encimi, ki hidrolizirajo peniciline, monobaktame, cefalosporine 3. in 4. generacije. Njihovo delovanje lahko inhibira klavulanska kislina. Večina jih spada v Amblerjev razred A, nekaj tudi v razred D. Med seboj se razlikujejo po biokemijskih lastnostih, kot je npr. aktivnost proti določenemu beta-laktamu (Giske in sod., 2013).

Prvi ESBL sev so odkrili leta 1983 v Nemčiji in od takrat so se encimi uspešno razširili po celem svetu. Prisotnost ESBL encimov je najpogostejša pri enterobakterijah, predvsem pri bakterijskih vrstah *Escherichia coli* in *K. pneumoniae*. Danes je znanih preko 200 vrst ESBL encimov. Med klinično najbolj pomembne ESBL encime spadajo CTX-M, SHV- in TEM- encimi. Zapisi zanje se večinoma nahajajo na plazmidih, kar jim omogoča uspešno širjenje med različnimi bakterijskimi vrstami. Razširjenost ESBL je odvisna od skupine pacientov, tipa okužbe in geografske lokacije (Livermore, 2012).

TEM in SHV tipi ESBL so nastali iz prvotnih TEM in SHV penicilinaz. Različne mutacije v genih *bla_{tem-1}* in *bla_{shv-1}*, ki kodirata ta dva encima, so povzročile nastanek različic, ki so razširile spekter delovanja encima. Vsaka varianta encima ima malo drugačen nabor substratov, na katere deluje. Tretji tip ESBL, ki ni soroden TEM in SHV variantam je CTX-M. Gen, ki kodira CTX-M izvira iz kromosoma bakterijske vrste *Kluyvera* spp., ki sicer nima pomembne klinične vloge. Iz kromosoma se je gen prenesel na plazmide, ti pa so se kasneje prenesli na človeške bakterijske oportuniste. Obstaja 5 skupin CTX-M tipov ESBL, ki krožijo med bakterijskimi vrstami. Vsaka skupina dominira na različnih koncih sveta (Rupp in Fey, 2003; Livermore, 2012).

2.3.2 Beta laktamaze AmpC

Beta-laktamaze AmpC so cefalosporinaze, ki spadajo v Amblerjev razred C. Hidrolizirajo peniciline, cefalosporine (3. in nekatere iz 4. generacije) in monobaktame. Šibko jih lahko inhibirajo klasični inhibitorji beta-laktamaz, med katerimi so najbolj učinkoviti kloksacilin, oksacilin in aztreonam (Jacoby, 2009).

AmpC so prvič identificirali leta 1980 in od takrat naprej so se ti encimi uspešno razširili po celotnem svetu. Obstaja več različnih tipov encimov AmpC, ki izvirajo iz naravnih producentov. To so *Enterobacter* skupina (MIR, ACT), *Citrobacter freundii* skupina (CMY-2-podobni, LAT, CFE), *Morganella morganii* skupina (DHA), *Hafnia alvei* skupina (ACC), *Aeromonas* skupina (CMY-1 podobni, FOX, MOX) in *A. baumannii* skupina (ABA). Najbolj razširjeni in pogosti so CYM-2 podobni encimi. Zapisi za beta laktamaze AmpC se lahko nahajajo na kromosomu ali na plazmidih (Giske in sod., 2013).

Najpogostejši producenti AmpC encimov so bakterijske vrste: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* in *Proteus mirabilis*. Številne enterobakterije in nekateri po Gramu negativni bacili lahko encime AmpC izražajo konstitutivno v majhnih koncentracijah (*E. coli*, *A. baumannii*) ali inducibilno, v kolikor je prisoten kakšen od beta-laktamskih antibiotikov (*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*) (Giske in sod., 2013).

2.4 KARBAPENEMAZE

Karbapenemaze predstavljajo najbolj vsestransko družino beta-laktamaz s spektrom delovanja, ki ni primerljiv z nobenim drugim beta-laktamskim encimom. Kljub poimenovanju karbapenemaze, večina encimov prepozna vse beta-laktamske antibiotike, pri tem pa so odporni na delovanje skoraj vseh klinično dostopnih inhibitorjev beta-laktamaz (Queenan in Bush, 2007).

Karbapenemaze so poznane že od začetka uporabe imipenema. Beta-laktamske antibiotike izdelujejo nekatere talne bakterije (*Streptomyces* spp.) in glive. Ostale bakterije, ki se nahajajo v istem okolju, so tekom evolucije začele izdelovati encime, ki so antibiotike razgradile, s tem pa si zagotovile preživetje. Prve karbapenemaze so našli pri okoljskih bakterijskih vrstah, kot so *Bacillus cereus* (BCII), *Bacteroides fragilis* (CfiA) in *Xanthomonas* (kasneje *Stenotrophomonas*) *maltophilia* (L1). Zanimive so postale, ko so jih prvič dokazali v kliničnem izolatu leta 1990 na Japonskem. Prve karbapenemaze so bile vrstno specifične, zapisi zanje pa so se nahajali na kromosomih. Od leta 1990 so se razširile plazmidno kodirane karbapenemaze, ki se enostavno širijo med različnimi bakterijskimi vrstami (Rao, 2012; Walsh, 2010).

Karbapenemaze se glede na funkcionalno razvrstitev nahajajo v skupinah 2f, 2df in 3. Po molekularni klasifikaciji se delijo v 3 skupine (A, B in D) (Rao, 2012).

2.4.1 Karbapenemaze iz razreda A

Serinske karbapenemaze iz razreda A po molekularni razdelitvi spadajo v skupino 2f. Od odkritja pred dvajsetimi leti se sporadično pojavljajo v kliničnih izolatih. Glede na filogenetske lastnosti se delijo na pet večjih družin: GES, KPC, SME, IMI in NMC. Zanje je značilna prisotnost serina v aktivnem mestu ter disulfidna vez med Cys69 in Cys238, ki stabilizira strukturo encima in je pomembna za hidrolizo antibiotikov. Hidrolizirajo peniciline, karbapeneme, aztreonam, zgodnje cefalosporine in cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja. Imajo večjo aktivnost proti imipenemu kot proti meropenemu. Njihovo delovanje lahko preprečita splošna inhibitorja beta-laktamaz, kot sta klavulanska kislina in tazobaktam (Rao, 2012; Walsh, 2010).

2.4.1.1 Kromosomsko kodirane karbapenemaze

Med kromosomsko kodirane karbapenemaze spadajo SME, NMC in IMP. Zanje je značilno, da so odporne proti penicilinom, zgodnjim cefalosporinom, aztreonamu, karbapenemom in občutljive na cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja. Njihovo izražanje lahko sproži prisotnost imipenema ali cefoksitina (Queenan in Bush, 2007).

SME (ang. *Serratia marcescens* carbapenemase) so prvič našli pri izolatu bakterije *Serratia marcescens* v Angliji leta 1982. Obstajajo 3 različni tipi encimov SME (SME-1, SME-2 in SME-3), ki se med seboj razlikujejo v eni aminokislini. SME-2 in SME-3 so kmalu za SME-1 našli v ZDA, Kanadi in Švici (Rao, 2012; Livermore in Woodford, 2000).

IMI (ang. imipenem hydrolizing β -lactamase) so prvič našli pri izolatu bakterije *Enterobacter cloacae* v ZDA, leta 1984. Od takrat so encime redko našli pri kliničnih izolatih *E. cloacae* v Franciji, Argentini in ZDA. Na Kitajskem so poročali o IMI-2, katerega gen je bil zapisan na plazmidu (Rao, 2012).

Encim NMC (ang. not metalloenzyme carbapenemase) so leta 1990 prvič izolirali iz izolata *E. cloacae* v Franciji. O njem so poročali tudi v ZDA in Argentini (Rao, 2012).

Vsi trije so si med seboj podobni po aminokislinskem zaporedju. Za NMC in IMI-1 je značilna 97 % identičnost, medtem ko so si NMC-1, IMI-1 in SME-1 identični v 70 % (Queenan in Bush, 2007).

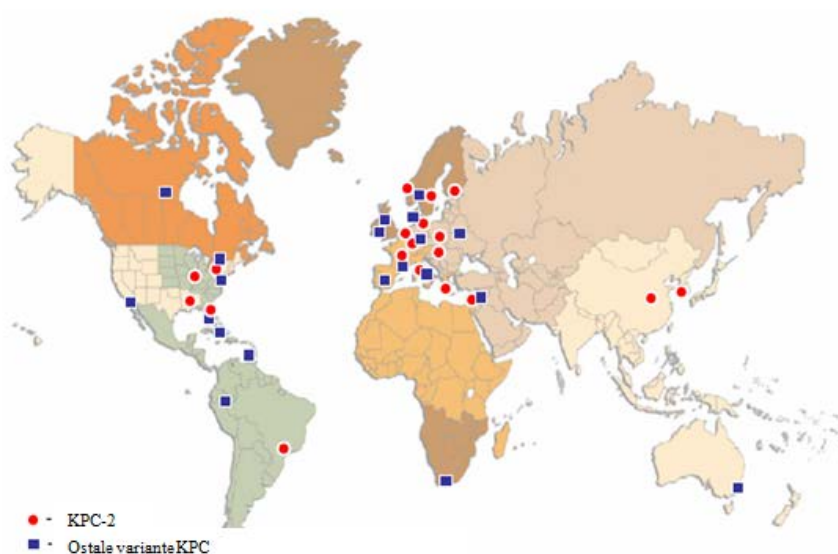
2.4.1.2 Plazmidno kodirane karbapenemaze

Encime GES (ang. Guiana extended spectrum) so prvič našli pri izolatu bakterije *K. pneumoniae*, leta 2000 v francoski Gvajani. Najprej so jih zaradi močne hidrolize cefalosporinov z razširjenim spektrom delovanja uvrščali med ESBL. Kasneje so ugotovili, da lahko nekateri šibko hidrolizirajo imipenem. Trenutno je znanih 22 GES tipov. Karbapenemazno aktivnost imajo: GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11 in GES-11. Zapisi za encime se nahajajo na plazmidih. Med seboj se razlikujejo v 1-4 aminokislinah. Encime so našli pri bakterijah *K. pneumoniae*, *E. coli* in *P. aeruginosa* v različnih državah po svetu (Grčija, Francija, Portugalska, J Afrika, Francoska Gvajana, Argentina, Koreja in Japonska) (Patel in Bonomo, 2013).

KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) so prvič našli pri kliničnem izolatu bakterije *K. pneumoniae* leta 1996 v severni Karolini (ZDA). Od takrat je prevladujoča karbapenemaza pri kliničnih izolatih v ZDA. Do leta 2004 so se ti encimi pojavljali le v Ameriki. Prvi primer karbapenemaze KPC izven ZDA, so leta 2006 opisali v Tel Avivu (Izrael), pri bolniku, ki se je pred tem zdravil v New Yorku. Od tedaj bakterije s encimi KPC povzročajo manjše izbruhe po celem svetu (Kitajska, Kolumbija, Škotska, Nemčija, Francija, Švica, Italija, Turčija, Poljska). Na sliki 4 je prikazana geografska razširjenost encimov KPC (Gupta in sod., 2011; Robustillo Rodela in sod. 2012).

Družina encimov KPC se od ostalih predstavnikov razreda A ločijo po tem, da se zapisi zanje nahajajo le na bakterijskih plazmidih, zaradi česar imajo največji potencial širjenja. Na plazmidih, na katerih so kodirani, se v večini primerov nahajajo tudi geni, ki

posredujejo odpornost proti fluorokinolonom in aminoglikozidom. Poleg tega so odporni tudi proti cefotaksimu. Hidrolizirajo vse razrede beta-laktamov, med temi pa najbolj učinkovito nitrocefim, cefalotin, cefaloridin, benzilpenicilin, ampicilin in piperacilin. Odpornost proti karbapenemu velikokrat ni očitna. MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) vrednosti so pogosto nižje od smernic, zato lahko encimi velikokrat ostanejo nedetektirani. Njihovo delovanje inhibira klavulanska kislina. Najpogostejše so prisotni pri bakteriji *K. pneumoniae*, našli pa so jih tudi že pri bakterijah *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *K. oxytoca*, *E. coli* in *P. aeruginosa*. Trenutno je znanih 12 encimov KPC. Do novih različic prihaja zaradi točkovnih mutacij v genu, ki kodira določen encim KPC. V Evropi prevladuje različica encima KPC-2 (Queenan in Bush, 2007; Rao, 2012).



Slika 4: Geografska razporeditev encimov KPC po svetu (Walsh, 2010).

2.4.2 Karbapenemaze iz razreda B

Metalo beta-laktamaze so molekularno najbolj raznolike karbapenemaze. Glavna lastnost, ki jih razlikuje od drugih karbapenemaz je, da v aktivnem mestu vsebujejo en ali dva cinkova iona. Le-ti koordinirajo dve molekuli vode v aktivnem mestu encima, ki sta potrebni za hidrolizo amidne vezi v beta-laktamskem obroču. Znotraj razreda B se encimi delijo na tri podskupine (B1-B3). B1 in B3 imata v aktivnem mestu prisotna dva cinkova iona, medtem ko ima podskupina B2 samo enega. Vezava dodatnega cinkovega iona na MBL v B2 podskupini lahko zmanjša aktivnost encimov. Encimi MBL so si med seboj glede na aminokislinsko zaporedje homologni le 25 %. Vsi pa imajo enako, unikatno proteinsko zgradbo ($\alpha\beta\alpha$) (Jones in sod., 2005; Rao, 2012).

Odporne so proti karbapenemom, cefalosporinom, penicilinom in splošnim inhibitorjem beta-laktamaz. Občutljivi so za aztreonam in inhibicijo s kovinskimi kelatorji, kot je EDTA. Mehanizem hidrolize je odvisen od interakcije med beta-laktamom in cinkovim ionom v aktivnem mestu encima. V prisotnosti EDTA se encim ne more povezati z beta-laktamom, zato ne pride do hidrolize antibiotika. MBL so že ves čas razširjene med bakterijami *P. aeruginosa* in *A. baumannii*, v zadnjem času pa se z zaskrbljujočo hitrostjo širijo med enterobakterijami (Queenan in Bush, 2007; Rao, 2012).

2.4.2.1 Kromosomsko kodirane MBL

Prve metalo beta-laktamaze so našli pri okoljskih in oportunističnih bakterijah kot so: *B. cereus* (BCI, BCII), *Aeromonas* spp. (CphA), *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Bacteroides fragilis* (CcrA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB ali GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1) *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) in *Serratia fonticola* (SFH-1). Zapisi za encime se nahajajo na kromosomih, na katerih so v večini primerov tudi geni za serinske beta-laktamaze. Obojni se izražajo, kadar so bakterije izpostavljene beta-laktamskim antibiotikom. Ker te bakterijske vrste niso povezane z resnimi bolnišničnimi okužbami, kromosomske metalo beta-laktamaze niso podvržene hitremu širjenju (Walsh in sod., 2005).

2.4.2.2 Plazmidno kodirane metalo beta-laktamaze

Večina genov, ki kodirajo MBL, so del genskih kaset, ki so vključene v integrone razreda 1 ali 3. Za metalo beta-laktamaze SPM, GIM in SIM je značilno, da se niso razširile izven držav izvora, medtem ko so IMP, VIM in NDM prisotne po celem svetu. Slednje so se v večini primerov prenesle iz bakterije *P. aeruginosa* na enterobakterije. Slika 5 prikazuje geografsko razširjenost metalo beta-laktamaz (Jones in sod., 2005; Queenan in Bush, 2007).

SPM-1 (Sao Paulo MBL) so prvič detektirali pri izolatu *P. aeruginosa* v Sao Paulu (Brazilija). Encim ni del integrona. Gen za SPM-1 je del otoka patogenosti, ki se nahaja na plazmidih (Rao, 2012).

GIM-1 (ang. German imipenemase) so prvič detektirali v Nemčiji, leta 2002. Zanj je značilno, da ne hidrolizira azlocilina, aztreonama in inhibitorjev serinskih beta laktamaz (Rao, 2012).

SIM-1 (ang. Seoul imipenemase) so prvič detektirali pri izolatih *P. aeruginosa* in *A. baumannii* medtem, ko so testirali odpornost izolatov proti imipenemu. Za vse so značilni nizki MIK-i za imipenem in meropenem (8-16 µg/mL) (Rao, 2012).

Ostale metalo beta-laktamaze, ki so omejene na države izvora, so še: KHM-1 (ang. Kyorin Health Science MBL), izolirana iz bakterije *Citrobacter freundii* na Japonskem, AIM-1 (ang. Australian imipenemase), izolirana iz *P. aeruginosa* v Avstraliji, DIM-1 (ang. Dutch imipenemase), izolirana iz *Pseudomonas stutzeri* na Nizozemskem, SMB-1 (*S. marcescens* MBL), izolirana iz bakterije *S. marcescens* na Japonskem, TMB-1 (Tripoli MBL), izolirana iz *Achromobacter xylosoxidans* v Libiji in FIM-1 (ang. Florence imipenemase), izolirana iz bakterije *P. aeruginosa* v Italiji (Patel in Bonomo, 2013).

IMP (ang. active on imipenem) so prvič našli v izolatu bakterije *P. aeruginosa* na Japonskem, leta 1990. Gen za encim se je nahajal na konjugativnem plazmidu. Tri leta kasneje so ga našli pri bakterijah *S. marcescens* in *B. fragilis*. Še dve leti kasneje so gen *bla_{IMP-1}* pri bakteriji *S. marcescens* našli znotraj integrona na 120 kb plazmidu. Tip IMP-2 so prvič detektirali v Italiji (prvi primer IMP v Evropi). Gen za encim je bil del genske kasete znotraj integrona razreda 1. Od takrat so IMP metalo beta-laktamaze prisotne po celem svetu. Trenutno je znanih 42 tipov IMP encimov, še vedno pa prevladujejo na Japonskem. Encimi se najpogosteje nahajajo pri bakterijskih vrstah *P. aeruginosa* in *A. baumannii*, vse pogosteje pa jih opisujejo pri enterobakterijah. (Walsh in sod., 2005; Patel in Bonomo, 2013).

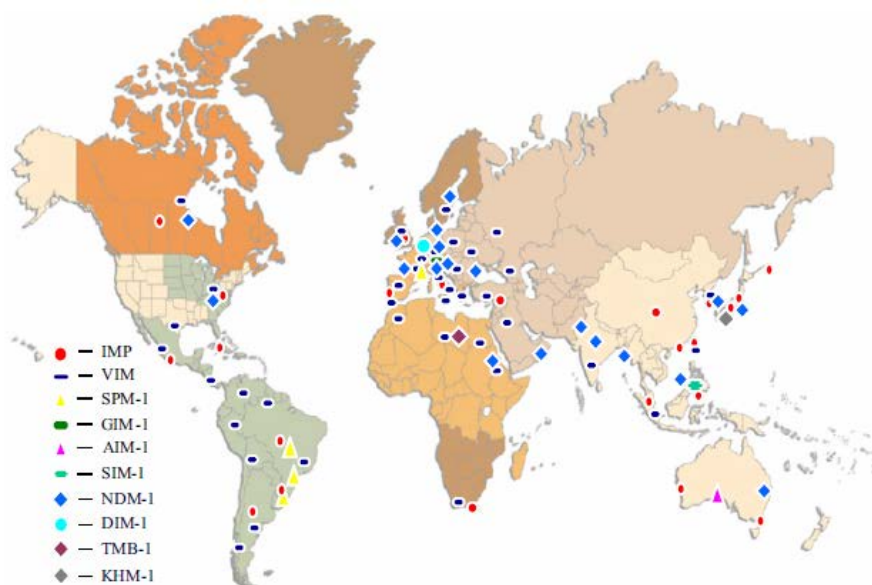
VIM (ang. Verona integron encoded metallo-β-lactamase) so prvič našli v izolatu *P. aeruginosa* v Veroni (Italiji) leta 1997. Danes so VIM encimi najpogosteje prisotni v Grčiji, Španiji, Izraelu in Italiji. Glede na aminokislinsko zaporedje so najbolj sorodni BCII (37 %). Trenutno je znanih 37 tipov encimov VIM. V Evropi prevladuje VIM-2. Detektirali so ga v več kot 23 bakterijskih vrstah (Rao, 2012).

NDM (New Delhi MBL) je najnovejša metalo beta-laktamaza, ki je v svetu prisotna od leta 2008. Glavni tip encima je NDM-1, pojavljajo pa se tudi že druge variante (NDM-2, NDM-3 in NDM-4). NDM so v glavnem prisotni pri enterobakterijah, predvsem pri bakterijah *K. pneumoniae* in *E. coli*, lahko tudi pri nefermentirajočih bakterijah in bakterijah iz družine *Vibrionaceae*. Širjenje encimov je predvsem vezano na prenos *bla_{NDM-1}* genov med promiskuitetnimi plazmidi in klonsko širjenje bakterijskih vrst. Bakterije z NDM-1 encimi so odporne proti skoraj vsem znanim antibiotikom. Izrednega pomena je njihova detekcija in nadzor (Nordmann in sod., 2011).

Vir karbapenemaz NDM ostaja neznanka. Sklepajo, da je v nekem okoljskem organizmu prišlo do premika genov iz kromosoma na mobilne genetske elemente. NDM-1 so prvič našli na Švedskem, pri bakterijskih vrstah *K. pneumoniae* in *E. coli*, ki so ju izolirali pri bolniku, ki se je pred tem zdravil v Indiji. Večina bolnikov, pri katerih so izolirali bakterije

z encimi NDM, so bili povezani z predhodnim bivanjem v indijskih deželah, kar kaže na izvor encimov. Od avgusta leta 2010 o NDM primerih poročajo po celem svetu, razen v centralni in Južni Ameriki. Kolonizacija črevesa z NDM-1 pozitivnimi bakterijami predstavlja možen vir fekalno-oralnega prenosa med ljudmi preko umazanih rok, hrane in vode. Velik rezervoar v Indiji predstavlja podtalnica in voda iz pip, kjer so NDM encime našli pri 11 različnih bakterijskih vrstah, med katerimi sta bili tudi *Shigella boydii* in *Vibrio cholerae*. Kot del črevesne flore so jih izolirali pri številnih turistih, ki so potovali po Indiji. Zadnja odkritja kažejo, da bi drug rezervoar encimov NDM-1 lahko predstavljale balkanske države (Patel in Bonomo, 2013; Nordmann in sod., 2011).

Zapisi za gene bla_{NDM-1} se večinoma nahajajo na različnih plazmidih (IncA/C, IncF, IncL/M), redko na kromosomih. Bakterije, ki imajo encim NDM-1, so odporne proti vsem penicilinom, cefalosporinom in karbapenemom. Odporne so tudi proti drugim razredom antibiotikov, saj plazmidi, na katerih se nahajajo geni NDM, vsebujejo gene za številne druge mehanizme odpornosti (odpornost proti aminoglikozidom in fluorokinolonom). Občutljive so samo za aztreonam in EDTA. Velikokrat imajo bakterije poleg NDM-1, tudi zapise za cefalosporinaze AmpC ali ESBL, kar jim omogoča odpornost proti aztreonamu (Nordmann in sod., 2011).



Slika 5: Razširjenost metalo beta-laktamaz po svetu (Walsh, 2010).

2.4.3 Karbapenemaze iz razreda D

Oksacilinaze predstavljajo heterogeno skupino beta-laktamaz, ki so sposobne hidrolizirati aminopeniciline in karboksipeniciline. Po funkcionalni klasifikaciji spadajo v podskupino 2df. Večina encimov je odpornih na delovanje komercialno dostopnih inhibitorjev beta-laktamaz. *In vitro* njihovo delovanje zavre natrijev klorid. Encimi OXA so med leti 1970 do 1980 predstavljali najbolj razširjeno družino beta-laktamaz, katerih zapisi so se nahajali na plazmidih. Najpogosteje so bili prisotni pri enterobakterijah in bakteriji *P. aeruginosa*. Definirali so jih kot penicilinaze, sposobne hidrolize oksacilina in kloksacilina. Šibko sta jih lahko inhibirala klavulanksa kislina in EDTA. Prvo različico encima OXA (OXA-11) z razširjenim spektrom delovanja, so prvič opisali leta 1993. Istega leta so opisali tudi prvo beta-laktamazo OXA s karbapenemsko aktivnostjo. Encim so našli pri večkratno odpornem kliničnem izolatu bakterije *A. baumannii*, ki so ga izolirali pri škotskem bolniku. Encim so najprej poimenovali ARI-1 (ang. *Acinetobacter* resistant to imipenem), kasneje pa preimenovali v OXA-23. Trenutno je znanih več kot 250 tipov encimov OXA, med katerimi je 9 beta-laktamaz z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) in vsaj 37 karbapenemaz (Queenan in Bush, 2007; Patel in Bonomo, 2013; Rao, 2012).

Karbapenemaze OXA so definirane kot encimi, ki hidrolizirajo peniciline, prvo generacijo cefalosporinov in kombinacije beta-laktamov z beta-laktamaznimi inhibitorji. Občutljivi so na delovanje cefalosporinov z razširjenim spektrom delovanja. Zaenkrat še ni poznanega inhibitorja beta-laktamaz, ki bi preprečil njihovo aktivnost. Hidroliza karbapenemov je šibkejša kot pri karbapenemazah iz drugih razredov. Pri organizmih, ki nosijo OXA karbapenemaze in kažejo visoko odpornost proti karbapenemom, imajo pogosto prisotne še dodatne mehanizme odpornosti (izražanje drugih karbapenemaz, mutacije/izguba porinov, aktivni transport antibiotikov iz celice). Največkrat so karbapenemaze OXA prisotne pri bakteriji *A. baumannii*, vse pogosteje pa jih najdemo pri enterobakterijah. Večina genov za karbapenemaze OXA se pri bakteriji *A. baumannii* nahaja na kromosomih. Pri klinično pomembnih izolatih se geni za karbapenemaze OXA najpogosteje nahajajo kot genske kasete na integronih, ki so vključeni v plazmide. Izjema so geni *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} in *bla*_{OXA-58} pri *A. baumannii* ter *bla*_{OXA-48} pri *K. pneumoniae*, ki se nahajajo na plazmidih (Patel in Bonomo, 2013; Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).

Karbapenemaze OXA se glede na aminokislinsko podobnost delijo v 9 glavnih podskupin (1-9), kot prikazuje preglednica 2. Njihova geografska razširjenost je prikazana na sliki 6. Encimi, ki so znotraj podskupin, so si med seboj identični v več kot 92,5 %, medtem ko so si encimi iz različnih podskupin identični v 40-70 % (Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).

Preglednica 2: Podskupine OXA beta-laktamaz z karbapenemazno aktivnostjo (Rao, 2012)

Podskupina	Družina	Ostali člani družine
1	OXA-23	OXA-27, OXA-49
2	OXA-24	OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72
3	OXA-51	OXA-64 do OXA-71, 75-78, 83, 84, 86-89, 91, 92, 94, 95
4	OXA-58	/
5	OXA-55	OXA-SHE
6	OXA-48	OXA-54, OXA-SAR2
7	OXA-50	OXA-50-a do OXA-50d
8	OXA-60	OXA-60a do OXA-60d
9	OXA-62	/

Od devetih podskupin, so štiri prvič našli pri izolatih bakterije *A. baumannii*, zbranih v Evropi, Južni Ameriki, Aziji in francoski Polineziji. Prvo podskupino sestavlja OXA-23, skupaj z OXA-27 in OXA-49. OXA-23 je prva opisana oksacilinaza s karbapenemazno aktivnostjo. Doslej so jo našli le pri izolatih bakterije *A. baumannii*. Zapisi za encim se lahko nahajajo na kromosomu ali na plazmidih. Razširjena je po celem svetu. Encimi v tej podskupini se med seboj razlikujejo v dveh do petih aminokislinah (Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).

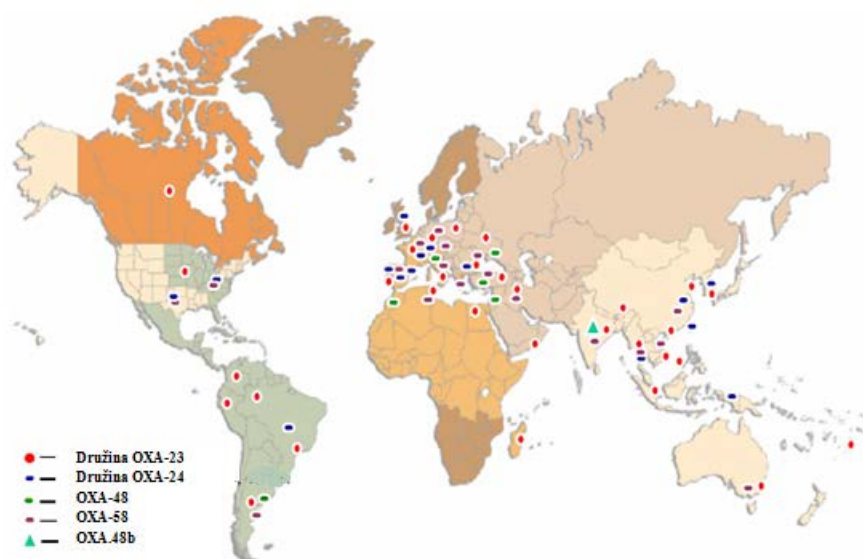
V drugo podskupino spadajo encimi OXA-24, -25, -26, -40 in -72. Ti se med seboj razlikujejo v 1 – 5 aminokislinah. Primarno so ti encimi vezani na pojavnost OXA pozitivnih bakterij v Španiji in na Portugalskem. OXA-24 in OXA-40 beta-laktamaze so izolirali tudi že v drugih evropskih državah in v ZDA. OXA-40 je celo prva opisana beta-laktamaza OXA v ZDA (Walther-Rasmussen in Høiby, 2006; Patel in Bonomo, 2013).

Tretjo podskupino sestavljajo encimi iz družine OXA-51. Geni zanje so naravno prisotni na kromosomih bakterije *A. baumannii*. Med seboj se razlikujejo v 1 – 15 aminokislinah. V četrti podskupini je le en predstavnik, ki je ostalim encimom OXA podoben v manj kot 50 %. Našli so ga pri izolatih bakterije *Acinetobacter* spp. v Franciji, Grčiji, Italiji, Romuniji, Turčiji, Argentini in Kuvajtu. V peti podskupini sta OXA-55 in OXA-SHE, katerih geni se nahajajo na kromosomu bakterije *Shewanella algae*. Med seboj se razlikujeta v petih aminokislinah (Queenan in Bush, 2007; Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).

OXA-48 so prvič identificirali leta 2004 pri izolatu bakterije *K. pneumoniae* v Turčiji. Sprva je bil encim omejen le na Turčijo, v zadnjih letih pa o njegovi prisotnosti poročajo pri številnih enterobakterijah v ostalih evropskih državah, Severni Afriki, Srednjem Vzhodu in ZDA, ki so postale pomemben rezervoar. Encimi močno hidrolizirajo peniciline, šibko karbapeneme in cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja. Poleg

tega so odporni proti delovanju beta-laktamaznih inhibitorjev. Zaradi tega je encim OXA-48 zelo težko identificirati. Geni za encim se nahajajo le na plazmidih. Trenutno širjenje *bla*_{OXA-48} je omejeno na širjenje plazmida IncL/M, ki ne vsebuje zapisov za druge mehanizme odpornosti. Obstaja vsaj 6 različic encima (OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 in OXA-232), med katerimi je globalno najbolj razširjen OXA-48. Zanj je značilna visoka afiniteta za imipenem (Patel in Bonomo, 2013; Poirel in sod., 2012).

Sedmo in osmo podskupino predstavljajo encimi OXA-50 pri bakteriji *P. aeruginosa* in OXA-60 pri bakteriji *Ralstonia pickettii*. V vsaki podskupini so prisotne različice encimov. Člani OXA-50 se med seboj razlikujejo v 1-5 aminokislinah, medtem ko se člani OXA-60 med seboj razlikujejo v 1-21 aminokislinah. Geni za encime se nahajajo na kromosomih, zanje pa je značilno, da se ne izražajo konstitutivno, poleg tega pa nimajo očitne karbapenemazne aktivnosti. OXA-62 je edini predstavnik devete podskupine. Gre za vrstno specifično oksacilinazo, ki se nahaja le pri bakterijski vrsti *Pandorae pnomenusa* (Queenan in Bush, 2007; Walther-Rasmussen in Høiby, 2006).



Slika 6: Globalna razširjenost karbapenemaz OXA (Walsh, 2010).

2.4.4 Zdravljenje

Trenutno je dostopnih le nekaj antimikrobnih učinkovin za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo proti karbapenemom odporne bakterije. Dodatni mehanizmi odpornosti, ki posredujejo odpornost proti ne-beta-laktamom, kot so aminoglikozidi in fluorokinoloni, še bolj zmanjšajo že tako omejeno izbiro antibiotikov. Na izbiro ostanejo le še polimiksini

(tudi kolistin), tigeciklin in fosfomicin, vendar je občutljivost za te antibiotike nepredvidljiva (Patel in Bonomo, 2013).

Začetek uporabe polimiksinov (polimiksina B in kolistina) sovpada s pojavom odpornosti med po Gramu negativnimi bacili. Polimiksini so ciklični peptidi, ki delujejo na bakterijsko celično membrano. Zaradi nastanka lukenj v membrani, se povečuje prepustnost celice, kar na koncu vodi v celično smrt. Zanje sta značilna nefro- in nevrotoksičnost, zato je njihova uporaba omejena. Nekateri strokovnjaki zagovarjajo uporabo polimiksina v kombinaciji z drugim agensom, kot na primer: rifampicin, tigeciklin ali kakšnim od karbapenemov (Marsik in Nambiar, 2011; Patel in Bonomo, 2013).

Tigeciklin je *in vitro* aktiven proti ESBL enterobakterijam in nekaterim proti karbapenemom odpornim enterobakterijam in izolatom bakterije *A. baumannii*. Tigeciklin je polsintetični glicilciklin, ki deluje bakteriostatično tako, da inhibira translacijo bakterijskih proteinov s tem, ko se veže na 30S ribosomsko podenoto. Ni priporočljiv za uporabo pri otrocih, poleg tega pa odpornost proti njemu narašča (Marsik in Nambiar, 2011; Patel in Bonomo, 2013).

Povečevanje odpornosti proti tigeciklinu in polimiksinom je povzročila ponovno uporabo starejših protimikrobnih zdravil, kot so kloramfenikol, nitrofurantoin in temocilin. Med njimi je tudi fosfomicin, ki je učinkovit proti patogenom, ki povzročajo urogenitalne infekcije in so odporni proti karbapenemom. Proti ostalim patogenom, fosfomicin ni dovolj učinkovit (Patel in Bonomo, 2013).

V razvoju je nekaj antibiotikov, ki *in vitro* kažejo učinkovito aktivnost proti karbapenemom odpornim bakterijam. Med njimi so novi inhibitorji beta-laktamaz, derivati aminoglikozidov, derivati polimiksinov, monobaktami ter kombinacije monobaktamov z inhibitorji beta-laktamaz (Patel in Bonomo, 2013).

Avibaktam ali NXL104 je inhibitor beta-laktamaz. Testiran je bil v kombinaciji s ceftazidimom, ceftarolinom in aztreonamom. Kombinacija cefalosporin-avibaktam ni inhibirala metalo beta-laktamaz. Kombinacija avibaktam-aztreonam je *in vitro* aktivna proti izolatom, ki izražajo različne mehanizme odpornosti proti karbapenemom, vključno proti metalo beta-laktamazam. Kljub temu ta kombinacija še ni dostopna za uporabo. Lastnosti kombinacij ceftazidim-avibaktam in ceftarolin-avibaktam doslej še niso znane, saj so še v fazi testiranja. ME1071 je derivat maleične kisline, ki je v kombinaciji z karbapenemom (biapenem, doripenem, meropenem, imipenem) uspešno aktiven proti enterobakterijam in bakteriji *A. baumannii*, ki imajo IMP, VIM in NDM tipe MBL. Plazomicin (ACHN-490) je derivat aminoglikozida, ki ima močno aktivnost proti nekaterim proti karbapenemom odpornim, po Gramu negativnim bacilom, predvsem proti nekaterim izolatom *A. baumannii* in *P. aeruginosa*. NAB739 in NAB7061 sta derivata

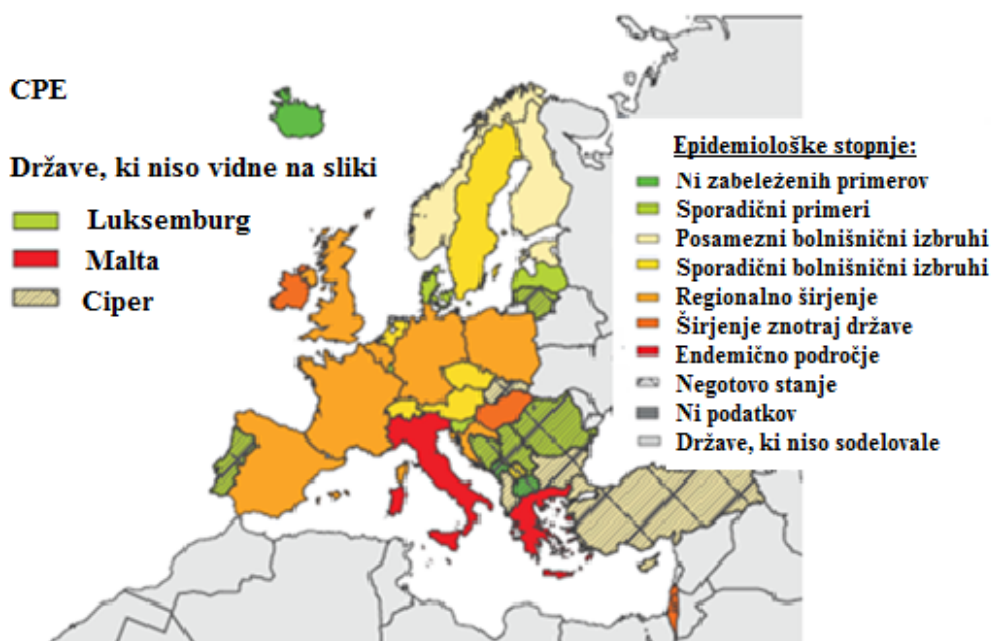
polimiksinov, ki kažeta manjšo nefrotoksičnost kot trenutno komercialno dostopni polimiksini. *In vitro* sta oba učinkovita proti enterobakterijam ter izolatoma *A. baumannii* in *P. aeruginosa*, ki izločajo karbapenemaze. Vse lastnosti doslej še niso poznane, saj sta oba še v fazi testiranja. Monosulbaktam BAL30072 kaže aktivnost proti nefermetirajočim, po Gramu negativnim bacilom, ki nosijo zapise za karbapenemaze OXA. BAL 30376 je kombinacija monobaktama in klavulanske kisline. V *in vitro* eksperimentih uspešno inhibira OXA (tudi OXA-48), MBL, ne pa karbapenemaz KPC (Patel in Bonomo, 2013).

2.4.5 Razširjenost CPE (ang. Carbapenemase producing enterobacteria) v Evropi

V letu 2013, je v mesecu februarju izšlo poročilo o razširjenosti karbapenemaz v Evropi. Stanje razširjenosti le-teh, je prikazano na sliki 7. Poročilo o stanju prisotnosti proti karbapenemom odpornih enterobakterij v njihovi državi je oddalo 39 evropskih držav (Glasner in sod., 2013).

Na Islandiji, v Črni Gori in Makedoniji niso zabeležili nobenega primera CPE. O sporadičnih bolnišničnih primerih so poročali v 22 državah. V 11-ih državah so poročali o širjenju prisotnosti CPE po državi, medtem ko so v treh (Grčija, Italija in Malta) redno izolirali karbapenemaze v večini državnih bolnišnic. Med 31 državami, ki so v študiji sodelovale že leta 2010, je v 17-ih do leta 2013 naraslo število ugotovljenih CPE. Med slednje spada tudi Slovenija. Vsako leto se pojavi nekaj primerov CPE, njihovo število pa vedno bolj narašča. Med dokazanimi karbapenemazami so se znašli že vsi glavni tipi (KPC, NDM-1, VIM, OXA-48) (Glasner in sod., 2013).

V večini evropskih držav so glavni producenti karbapenemaz enterobakterije, njihova prisotnost pa vedno bolj narašča. V Italiji so KPC v zadnjih letih prevladale karbapenemaze VIM. Ravno obratno se je zgodilo na Madžarskem. Najbolj razširjene še vedno ostajajo karbapenemaze KPC, vse bolj pa narašča število OXA-48 pozitivnih izolatov. Ti že prevladujejo v Belgiji, Franciji in na Malti. Največ primerov NDM-1 je med evropskimi državami zabeležila Velika Britanija (Glasner in sod., 2013)



Slika 7: Razširjenost enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze(CPE) v 39 evropskih državah (Glasner in sod., 2013).

2.4.6 Metode za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz

Za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz obstaja več različnih metod. Ameriška priporočila CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute) in evropska priporočila EUCAST (ang. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) za klinično dokazovanje in identifikacijo, priporočata točno določene metode (preglednica 3). Do aprila, leta 2014 je Slovenija uporabljala ameriške smernice (CLSI, 2013). Od aprila 2014 naprej se v Sloveniji uporabljajo evropske smernice (EUCAST, 2014).

Ko se pri osnovnem antibiogramu pojavijo izolati, ki so odporni (R) ali zmerno občutljivi (I) proti enemu ali več karbapenemom in cefalosporinom 3. generacije (cefoperazon, cefotaksim, ceftazidim, ceftizoksime in ceftriakson), je potrebno izvesti presejalne in potrditvene metode za dokaz prisotnosti proti karbapenemom odpornih bakterij (CLSI, 2013).

Preglednica 3: Primerjava smernic za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz, ki jih določata EUCAST in CLSI (APBA = aminofenil boronična kislina, PBA = fenil boronična kislina, DPA = dipikolonična kislina, CLX = kloksacilin, / = test ni priporočen) (EUCAST, 2014; CLSI 2013).

Metoda	EUCAST	CLSI
	<u>PRESEJALNE METODE</u>	
Določitev MIK [mg/L]	Meropenem: $S \leq 2$, $R > 8$ Imipenem: $S \leq 2$, $R > 8$ Ertapenem: $S \leq 0,5$, $R > 1$	Meropenem: 2-4 mg/L Imipenem: 2-4 mg/L Ertapenem: 2 mg/L
Disk difuzijski test	Meropenem: ≥ 22 mm Imipenem: ≥ 22 mm Ertapenem: ≥ 25 mm	Meropenem: 16-21 mm / Ertapenem: 19-21 mm
	<u>POTRDITVENE METODE</u>	
Modificiran test Hodge	Ni priporočljiv	Ojačana rast okoli pozitivne kontrole in testnega organizma
Kombinacija karbapenemov z inhibitorji:	Inhibicijska cona: meropenem < 25 mm ali MIK $> 0,12$ mg/L pri vseh enterobakterijah: • Sinergija: APBA/PBA: KPC (ali ostale karbapenemaze iz razreda A) • Sinergija: APBA/PBA in kloksacilin: AmpC • Sinergija z DPA: MBL • Ni sinergije: ESBL + izguba porinov ali OXA-48	/
Carba NP (Nordmann in sod., 2012)	Sprememba barve iz rdeče v rumeno/oranžno	/
PCR	Določitev tipa karbapenemaze	/

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZOLATI

V raziskavo smo vključili 49 kliničnih izolatov enterobakterij, zbranih v letu 2013 v dveh zdravstvenih ustanovah. 30 izolatov je bilo zbranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik ter 29 izolatov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. Izolati, ki smo jih uporabili, so bili predhodno identificirani s standardnimi identifikacijskimi testi, kot pripadniki rodu *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes* in *Klebsiella pneumoniae*). Kriterij za vključitev izolatov v raziskavo je bila odpornost ali zmanjšana občutljivost proti vsaj enemu od karbapenemov. Med vključenimi izolati smo za ugotavljanje specifičnosti uporabljenih metod uporabili tudi takšne, ki niso bili odporni proti nobenemu od karbapenemov. Metode dokazovanja karbapenemaz smo razdelili na presejalne in potrditvene metode.

Med presejalne metode spadajo:

- Disk difuzija – osnovni antibiogram (določitev inhibicijskih con).
- Kultivacija na kromogenem gojišču ESBL za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja.
- Kultivacija na kromogenem CRE gojišču za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze.
- Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradienta.

Med potrditvene metode spadajo:

- Modificiran test Hodge.
- Test Carba NP.
- Metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz.
- Določanje genov za karbapenemaze z verižno reakcijo s polimerazo (ang. polymerase chain reaction – PCR).

Izolati so bili shranjeni pri -70 °C. Shranjene isolate smo oživeli v tekočem gojišču Luria-Bretani. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo z 10 µL bakteriološko zanko bakterijsko kulturo inokulirali na BHI agar. Plošče smo inkubirali pri 37 °C 24 ur. Bakterijske kolonije iz teh plošč smo uporabljali za nadaljne teste.

3.1.1 Recepti za pripravo uporabljenih gojišč

3.1.1.1 Tekoče gojišče Luria-Bretani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB, smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 25 g gojišča LB agarja (BD, Sparks, ZDA). Po 4,5 ml raztopljenega gojišča smo odpipetirali v epruvete in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

3.1.1.2 Priprava trdnih gojišč BHI (Brain Heart Infusion)

Za pripravo trdnih BHI agarjev smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 37 g BHI (Brain Heart Infusion) gojišča (BD, Sparks, ZDA) in 15 g agarja (Bacto agar) (BD, Sparks, ZDA) ter ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 45 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.1.1.3 Priprava trdnih gojišč MH (Mueller Hinton agar)

Za pripravo Mueller Hinton agarja smo v 1 L demineralizirane vode raztopili 38 g MH agarja (BD, Sparks, ZDA) ter ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 45 °C, smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke.

3.2 PRESEJALNE METODE ZA DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI KARBAPENEMAZ PRI ENTEROBAKTERIJAH

3.2.1 Disk difuzijski antibiogram – osnovni antibiogram

Gre za hitro in preprosto metodo določanja občutljivosti za antibiotike pri hitro rastočih bakterijah. Na zasejano ploščo položimo standardizirane diske, ki vsebujejo različne antibiotike v dogovorjeni koncentraciji. Koncentracija antibiotika v agarju je največja pod diskom in se nato zmanjšuje z oddaljenostjo od diska. Po 6-8 urah je širjenje antibiotika iz diska končano in razmere so stabilne.

Uporabili smo diske proizvajalca BD BBL (BD, New Jersey, ZDA). Za osnovni antibiogram smo uporabili naslednje antibiotike: ampicilin (10 µg), cefazolin (30 µg), trimetoprim + sulfametoksazol (25 µg), cefuroksim (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloksacin (5 µg), cefotaksim (30 µg), amoksicilin + klavulanska kislina (30 µg), ceftazidim (30 µg), amikacin (30 µg), piperacilin + tazobaktam (110 µg), ertapenem (10

μg), imipenem (10 μg), meropenem (10 μg), cefepim (30 μg), netilmicin (30 μg), aztreonam (30 μg), cefiksim (5 μg).

3.2.1.1 Izvedba testa

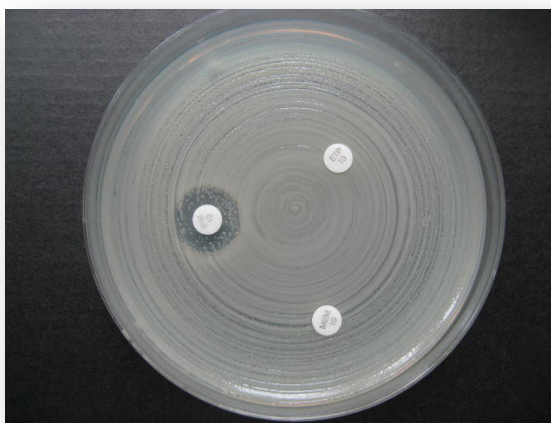
Za izvedbo osnovnih antibiogramov smo uporabili Mueller Hinton agar. Pripravili smo bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarlanda. Pripravljeno suspenzijo smo inokulirali z bombažnim brisom. Za kontrolo kakovosti smo pripravili suspenziji bakterijskih sevov: *E. coli* ATCC 25922 in *E. coli* ATCC 35218 (za kombinacije beta-laktam/beta-laktamaza inhibitor). Pokrov petrijevke smo pustili priprto 3 do 5 minut in nato položili antibiotične diske. Diske smo polagali s pomočjo dispenzorja, ki zagotovi primeren razmik med diski. Na eno ploščo smo položili 6 diskov. Plošče smo inkubirali pri 35 +/- 2 °C, 16-18 ur, aerobno.

3.2.1.2 Vrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo izmerili velikost inhibicijskih con (mm). Izmerjene vrednosti smo primerjali s standardnimi vrednostmi, ki so predpisane za posamezen antibiotik in vrsto bakterije (CLSI, 2013).

Stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata izrazimo kot:

- Občutljiv (ang. Sensitive - S): z običajnim odmerkom antibiotika dosežemo za bakterijo inhibitorno koncentracijo zdravila v krvi.
- Zmerno občutljiv (ang. Intermediate - I): odmerek zdravila določimo glede na mesto okužbe in MIK.
- Odporen (ang. Resistant - R): bakterija je proti antibiotiku odporna, zato zdravilo ni primerno za zdravljenje.



Slika 8: Disk difuzijski antibiogram za imipenem (IPM10), ertapenem (ETP10) in meropenem (MEM10) (izolat *K. pneumoniae*, ki izloča KPC).

3.2.2 Kultivacija na kromogenem gojišču ESBL

Gojišče Brilliance ESBL (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija) je kromogeno presejalno gojišče za ugotavljanje prisotnosti bakterij, ki izločajo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Omogoča detekcijo ESBL bakterij neposredno iz kliničnih vzorcev (slika 9). Kultivacijo na tem gojišču smo izbrali, ker naj bi na njem dobro rasle tudi bakterije, ki izločajo karbapenemaze (CPE).

Gojišče vsebuje antibiotike, ki preprečijo rast ESBL-negativnim in večini AmpC pozitivnim bakterijam. Razlikovanje med ESBL bakterijami omogoča prevzem dveh kromogenov, katerih tarča sta dva različna encima (galaktozidaza in glukuronidaza).

3.2.2.1 Izvedba testa

V fiziološki raztopini smo pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarland-a. Z mikrobiološko zanko smo inokulirali ESBL gojišče. Poleg vzorcev smo izvedli še kontrolo kakovosti gojišča. V ta namen smo inokulirali tudi kontrolne bakterijske seve, ki jih priporoča proizvajalec gojišč. Plošče smo inkubirali pri 37 °C, 24 ur, aerobno.

3.2.2.2 Vrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo opazovali barvo kolonij na gojišču:

- Modre do rožnate kolonije: *E. coli*.

- Zelene kolonije: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*.
- Rjave kolonije: *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*.
- Kolonije brez barve: *Salmonella*, *Acinetobacter* ali druge bakterije.



Slika 9: Rast na kromogenem ESBL agarju (izolat *K. pneumoniae*)

3.2.3 Kultivacija na kromogenem CRE gojišču za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze

Brilliance CRE gojišče (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija) je kromogeno presejalno gojišče za detekcijo proti karbapenemom odpornih enterobakterij, kot so *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* in *Citrobacter* neposredno iz kliničnih vzorcev. Gojišče vsebuje koncentracije karbapenemov, ki jih priporočata tako CLSI kot EUCAST.

Na gojišču glede na barvo kolonij ločimo *E. coli* (svetlo rožnate kolonije) od ostalih enterobakterij (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) (slika 10). Kolonije *E. coli* se obarvajo svetlo rožnato, medtem ko se kolonije ostalih obarvajo modro. Na gojišču lahko zrastejo tudi bakterije odporne proti karbapenemom, ki ne spadajo med enterobakterije (npr. *Acinetobacter*). Njihove kolonije so brezbarvne ali kremne barve, ki jih na turkizno obarvanem gojišču enostavno opazimo.

3.2.3.1 Izvedba testa

V fiziološki raztopini smo pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarland-a. Z mikrobiološko zanko smo inokulirali CRE gojišče. Poleg vzorcev smo izvedli še kontrolo kakovosti gojišča. V ta namen smo inokulirali kontrolne bakterijske seve, ki jih priporoča proizvajalec gojišč (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija). Plošče smo inkubirali pri 37 °C, 24 ur, aerobno.

3.2.3.2 Vrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo opazovali barvo kolonij na gojišču:

- Svetlo rožnate kolonije: *E. coli*.
- Modre kolonije: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*.
- Kolonije brez barve ali kremne barve: *Acinetobacter* ali druge bakterije.



Slika 10: Rast na kromogenem agarju za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze (Oxoid, 2014).

3.2.4 Določevanje MIK za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradienta

Določanje občutljivosti z E-testi (bioMérieux, Lyon, Francija) predstavlja kombinacijo difuzijskega in dilucijskega antibiograma, pri katerem lahko odčitamo MIK na trdnih gojiščih. Z E-testi potrjujemo občutljivost bakterij, za katere v osnovnem antibiogramu ugotovimo možnost pojava odpornosti.

3.2.4.1 Izvedba testa

Za izvedbo osnovnih antibiogramov se uporablja Mueller Hinton agar. Pripravili smo bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McFarlanda. Pripravljeni suspenzijo smo inokulirali z bombažnim brisom. Pokrov petrijevke smo pustili priprt 3 do 5 minut in nato položili trakove z impregniranim antibiotikom. Plošče smo inkubirali pri 37 °C, 24 ur, aerobno.

3.2.4.2 Vrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo odčitali minimalno inhibitorno koncentracijo antibiotika, pri kateri zaviralna elipsa (bakterijska kultura) seka trak E-testa (slika 11). Izmerjene vrednosti smo primerjali s standardnimi vrednostmi, ki so predpisane za posamezen antibiotik in vrsto

bakterije (CLSI, 2013; EUCAST, 2014). Slednje so predstavljene v preglednici 4. Stopnjo občutljivosti bakterijskega izolata izrazimo kot S, I ali R.



Slika 11: Določitev MIK za imipenem, ertapenem (levo) in meropenem (desno) z metodo difuzijskega gradienta (izolat *K. pneumonia*, ki izloča KPC).

Preglednica 4: Primerjava interpretacijskih kriterijev EUCAST (2014) in CLSI (2013) za opredeljevanje občutljivosti karbapenemov na osnovi izmerjenih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) (S = občutljiv, R = odporen, I = zmerno občutljiv).

Antibiotik	EUCAST [mg/L]		CLSI [mg/L]		
	S	R	S	I	R
Imipenem	≤ 2	>8	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem	$\leq 0,5$	>1	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Meropenem	≤ 2	>8	≤ 1	2	≥ 4

3.3 POTRDITVENE METODE ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ, KI JIH IZLOČAJO ENTEROBAKTERIJE

3.3.1 Določanje genov za karbapenemaze z verižno reakcijo s polimerazo

Gene za karbapenemaze smo določili s klasično metodo PCR.

3.3.1.1 Izvedba metode

Najprej moramo izolirati DNA. Izolacijo DNA iz kulture izvedemo z metodo kuhanja: v 300 µL sterilne vode resuspendiramo polno zanko kulture, inkubiramo 10 min pri 95 °C in centrifugiramo 3 min na 8000 rpm. Supernatant prenesemo v novo tubico in takoj zamrznemo.

Za izvedbo PCR potrebujemo:

- AptaTaq Fast PCR Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija)
- Začetni oligonukleotidi (TIB MOLBIOL, Berlin, Nemčija):
 - **Določanje KPC:** blaKPC Fw (ATg TCA CTg TAT CgC CgT CT) in blaKPC Rw (TTT TCA gAg CCT TAC TgC CC)
 - **določanje VIM** – blaVIM Fw (gAT ggT gTT Tgg TCg CAT A) in blaVIM Rw (CgA ATg CgC AgC ACC Ag)
 - **določanje IMP** – blaIMP Fw (ggA ATA gAg Tgg CTT AAT TCT C) in blaIMP Rw (CCA AAC CAC TAC gTT ATC T)
 - **določanje NDM** – NDM-For (gggCAgTCgCTTCCAACggT) in NDM-Rev (gTAgtgCTCAgtgTCggCAT)
 - **določanje OXA-48** – OXA48A (TTg gTg gCA TCg ATT ATC gg) in OXA48B (gAg CAC TTC TTT TgT gAT ggC)
- Pozitivne kontrole:
 - KPC *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705
 - VIM *K. pneumoniae* NCTC 13440
 - IMP *E. coli* NCTC 13476
 - NDM *K. pneumoniae* NCTC 13443
 - OXA-48 *K. pneumoniae* NCTC 13442

V mikrocentrifugirko po naslednjem vrstnem redu dodamo:

Preglednica 5: Količine reagentov za izvedbo PCR (25 μ L reakcija).

Reagenti	Količina [μ L]	Končna koncentracija
Voda	17,0	-
AptaTaq Fast PCR Master	5	1x
Začetni oligo-nt 1 (50 μ L)	0,25	0,5 μ M
Začetni oligo-nt 2 (50 μ L)	0,25	0,5 μ M
Vzorec	2,5	-
Skupaj	25	

Pomnoževanje DNA poteka po spodaj omenjenjih pogojih, odvisno od tarčnega mesta pomnoževanja:

Preglednica 6: Pogoji pomnoževanja DNA, odvisno od tarčnega mesta pomnoževanja.

Program	Število ciklov	Temperature (°C)	Čas (s)
Denaturacija	1	95	30
Prileganje	1	95	5
Pomnoževanje	30	KPC: 60 VIM: 58 OXA-48: 58 NDM-1: 60 IMP: 55	90
Ohlajanje	1	4	

3.3.1.2 Vrednotenje rezultatov

Pridelke PCR dokazujemo z elektroforezo v agaroznem gelu. Test je uspel, če je po pomnoževanju negativna kontrola ostala negativna in pozitivna kontrola pozitivna. Lego PCR pridelka vzorca v gelu lahko primerjamo z lego pozitivne kontrole in standardom molekulske mase. Prisotnost PCR pridelka ustrezne molekulske mase ovrednotimo kot pozitiven vzorec, odsotnost PCR pridelka ustrezne molekulske mase pa kot negativen vzorec.

3.3.2 Modificiran test Hodge

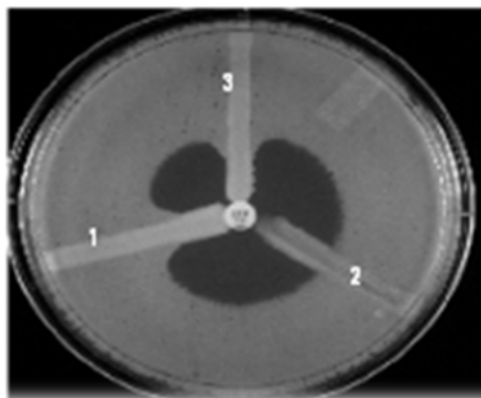
Modificiran test Hodge (MHT) je potrditveni fenotipski test za dokaz prisotnosti karbapenemaz, ki difundirajo v gojišče. Test je primeren za dokazovanje vseh skupin karbapenemaz. Občutljivost in specifičnost MHT sta ocenjeni na več kot 90 % pri sevih, ki izločajo karbapenemaze. Za dokaz skupine B in D občutljivost in specifičnost nista natančno opredeljeni in sta slabši kot za družino KPC iz skupine A. Občutljivost in specifičnost MHT pri bakterijah, ki tvorijo manjšo količino karbapenemaze, ni znana. MHT je lahko negativen tudi pri sevih z dokazanim genom za karbapenemazo. Opisani so lažno pozitivni in lažno negativni rezultati MHT. V našem primeru smo uporabili ertapenemski antibiotik. Zanj je znano, da je najbolj občutljiv za dokazovanje karbapenemaz.

3.3.2.1 Izvedba testa

V fiziološki raztopini pripravimo bakterijsko suspenzijo gostote 0,5 McF seva bakterije *E. coli* ATCC 25922. Suspenzijo nato redčimo 1:10 v fiziološki raztopini. Pripravljeno suspenzijo inokuliramo z bombažnim brisom. Pokrov pertijevke pustimo priprt 3 do 5 minut in nato na sredino položimo disk z ertapenemom. Z zanko zberemo 3-5 kolonij testnega seva, ki je zrasel na BHI agarju (največ 24 urna kultura) in inokuliramo v ravni črti od diska navzven. Črta mora biti dolga vsaj 20-25 mm. Na enak način inokuliramo kontrolna seva. Na agarsko ploščo s premerom 10 cm lahko nanese en testni sev in dva kontrolna seva (pozitivna in negativna kontrola). Plošče inkubiramo pri 37 °C, 16-20 ur, aerobno.

3.3.2.2 Vrednotenje rezultatov

Test je pozitiven, če je vidna ojačana rast okoli pozitivne kontrole in testnega seva, tako kot je prikazano na sliki 12.



Slika 12: Rezultat MHT testa. (1): pozitivna kontrola *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, (2): negativna kontrola *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706, (3) klinični izolat – pozitiven rezultat (Amjad in sod., 2011)

3.3.3 Metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz

Pri tej metodi se uporabljajo diski, ki vsebujejo samo karbapenem (imipenem ali meropenem) ali pa je ta v kombinaciji z določenim inhibitorjem beta-laktamaz. Boronična kislina je inhibitor karbapenemaz razreda A, medtem ko je dipikolonična kislina inhibitor karbapenemaz razreda B. Za razred D trenutno ni učinkovitega inhibitorja. Kombinacija s kloksacilinom se uporablja za ločevanje med AmpC, izgubo porinov in prisotnostjo karbapenemaz. Za izvedbo testa smo uporabili diske proizvajalca Rosco (Rosco, Taastrup, Danska), katerih premer je 9 mm.

Kombinacije, ki smo jih uporabili za določevanje karbapenemaz, kakor prikazuje slika 13:

- Imipenem (10 µg) (IMI)
- Imipenem (15 µg) + EDTA (750 µg) (IMI-EDTA)
- Meropenem (10 µg) (MEM)
- Meropenem + fenilboronična kislina (MRPBO)
- Meropenem + kloksacilin (MRPCX)
- Meropenem + dipikolonična kislina (MRPDP)
- Meropenem + fenilboronična kislina + dipikolonična kislina (MRBDP)

3.3.3.1 Izvedba testa

Za izvedbo smo uporabili Mueller Hinton agar. Pripravili smo bakterijsko suspenzijo motnosti 0,5 McFarlanda iz kolonij, poraslih na BHI gojišču. Pripravljeno suspenzijo smo inokulirali z bombažnim brisom, pri tem pa si pomagali z inokulacijsko rotacijsko ploščo. Pokrov pertijevke smo pustili priprt 3 do 5 minut in nato položili antibiotične diske. Diske proizvajalca Rosco smo polagali s pomočjo dispenzorja. Diski ne smejo biti narazen manj kot 24 mm (od centra do centra). Plošče smo inkubirali pri 35 ± 1 °C, 18-20 ur, aerobno.

3.3.3.2 Vrednotenje rezultatov

Po inkubaciji smo izmerili premer inhibicijskih con. Za določitev družine karbapenemaz smo sledili smernicam proizvajalca (Rosco, Taastrup, Danska).

Določanje karbapenemaz iz Amblerjevega razreda B

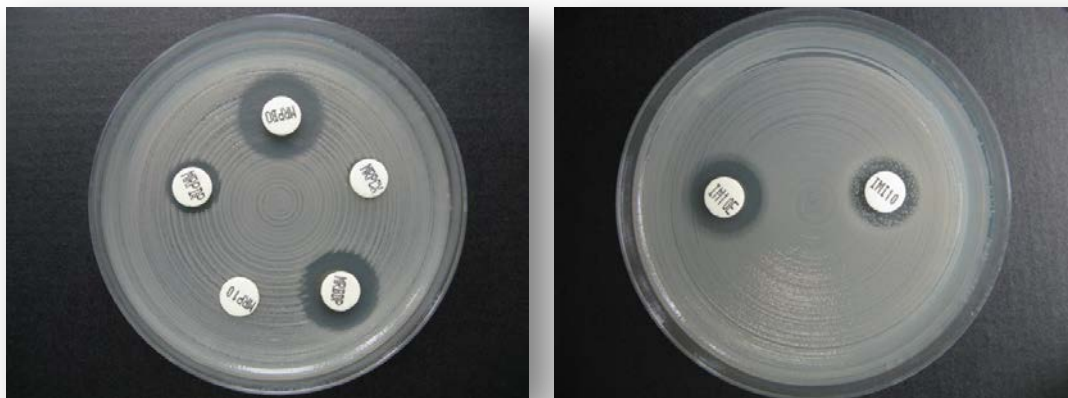
- Cona inhibicije pri disku, ki vsebuje kombinacijo imipenema in EDTA je ≥ 7 mm, kot pri disku, ki vsebuje le imipenem.
- Cona inhibicije okoli diska ki vsebuje kombinacijo meropenema in dipikolonične kisline je ≥ 5 mm, kot pri disku, ki vsebuje le meropenem.

Določanje karbapenemaz iz Amblerjevega razreda A

- Negativni rezultat testa za določevanje metalo beta-laktamaz.
- Cona inhibicije pri disku, ki vsebuje kombinacijo meropenema in fenilboronične kisline je ≥ 5 mm, kot pri disku, ki vsebuje le meropenem.
- Ni sinergije med diskom ki vsebuje kombinacijo maropenema in kloksacilina in diskom, ki vsebuje meropenem.
- Pozitiven modificiran test Hodge.
- Cona inhibicije pri disku, ki vsebuje kombinacijo meropenema in fenilboronične kisline je ≥ 5 mm, kot pri diskih, ki vsebujejo meropenem, meropenem v kombinaciji z dipikolonično kislino in meropenem v kombinaciji s kloksacilinom – prisotnost KPC encima.
- Cona inhibicije pri diskih, ki vsebujejo kombinacijo meropenema in fenilboronične kisline ter meropenema in kloksacilina je ≥ 5 mm, kot pri diskih z meropenemom in meropenemom v kombinaciji z dipikolonično kislino – prisotnost AmpC/izguba porinov/aktivno črpanje antibiotika iz celice.

Določevanje karbapenemaz iz Amblerjevega razreda D

- Negativni rezultati za določevanje metalo beta-laktamaz.
- Cona inhibicije pri diskih, ki vsebujejo kombinacijo meropenema in fenilboronične kisline ter meropenema in kloksacilina je < 5 mm, kot pri disku, ki vsebuje le meropenem.
- Pozitiven modificiran test Hodge.



Slika 13: Metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz (izolat *K. pneumoniae*, ki izloča KPC) (MRP10 = meropenem, MRPDP = meropenem + dipikolonična kislina, MRPBO = meropenem + fenilboronična kislina, MRPCX = meropenem + kloksacilin, MRBDP = meropenem + fenilboronična kislina + dipikolonična kislina, IMI10 = imipenem, IMI0E = imipenem + EDTA).

3.3.4 Test Carba NP

Test Carba NP temelji na *in vitro* hidrolizi imipenema. Hidroliza karbapenema povzroči dvig pH, kar se odraža v spremembi barve iz rdeče v rumeno/oranžno (Nordmann in sod., 2012c).

Za kontrolo kvalitete se uporabljajo bakterijski sevi:

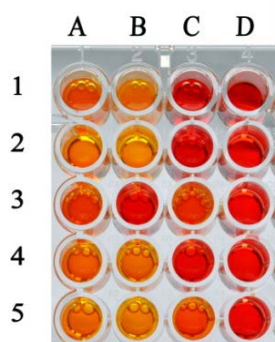
- pozitivna kontrola: *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705
- pozitivna kontrola: *K. pneumoniae* NCTC 13443
- negativna kontrola: *E. coli* ATCC 25922

3.3.4.1 Izvedba testa

Klinični izolat nacepimo na Mueller Hinton agar ter inkubiramo aerobno, pri 37 °C, 24 ur.

S plošče z 10 μ l zanko pobereмо čim več bakterijske kulture in jo prenesemo v 200 μ L Tris-HCl pufru (20 mmol/L). Vorteksiramo 1 min.

Nato pri sobni temperaturi inkubiramo 30 minut. Po inkubaciji centrifugiramo 5 minut, pri 10.000 g. V 100 μ L reagenta z imipenemom prenesemo 30 μ L supernatanta. Reagent z imipenemom pripravimo tako, da zmešamo 3 mg imipenem monohidrata (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francija), raztopino fenol rdečega in 0,1 mmol/L ZnSO₄ (Merck Millipore, Guyancourt, Francija). pH s 1M NaOH uravnamo na 7,8. Raztopino fenol rdečega pripravimo tako, da 2 mL 0,5 % fenol rdečega (Meck Millipore, Guyancourt, Francija) zmešamo z 16,6 mL destilirane vode. Inkubiramo dve uri, aerobno, pri 37 °C. Na vsakih 20 minut odčitamo rezultate.



Slika 14: Rezultati testa Carba NP.

3.3.4.2 Vrednotenje rezultatov

Sprememba barve iz rdeče v rumeno/oranžno (slika 14) pomeni prisotnost karbapenemaze.

3.4 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ

Za odločitev, kako uporabna je določena metoda za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz, je potrebno izračunati specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost. Občutljivost predstavlja odstotek pravilno klasificiranih pozitivnih primerov. Specifičnost predstavlja odstotek pravilno klasificiranih negativnih primerov. Pozitivna napovedna vrednost je verjetnost, da bakterija ima karbapenemazno aktivnost, če je test pozitiven. Negativna napovedna vrednost je verjetnost, da bakterija nima karbapenemazne aktivnosti, če je test negativen.

Zlati standard za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz je dokaz gena za karbapenemazo z metodo PCR, katere rezultati predstavljajo dejansko prisotnost/odsotnost karbapenemaz.

Glede na dobljene rezultate pri uporabljeni metodi določimo vrednosti TP (ang. true positive), FP (ang. false positive), TN (ang. true negative) in FN (ang. false negative). TP predstavlja število resnično pozitivnih primerov, FP število napačno določenih pozitivnih primerov, ki glede na PCR nimajo karbapenemazne aktivnosti, TN število resnično negativnih primerov, in FN število napačno določenih negativnih primerov, ki glede na PCR test imajo karbapenemazno aktivnost (Parikh in sod., 2008).

Enačbe za izračun specifičnosti, občutljivosti, pozitivne in negativne napovedne vrednosti

- Občutljivost = $TP / (TP + FN)$.
- Specifičnost = $TN / (TN + FP)$.
- Pozitivna napovedana vrednost = $TP / (TP + FP)$.
- Negativna napovedana vrednost = $TN / (TN + FN)$ (Parikh in sod., 2008).

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE GENOV ZA KARBAPENEMAZE Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMEZARO

V preglednici 7 so predstavljeni rezultati PCR metode. Izmed 49 testiranih izolatov, smo gen za karbapenemazo dokazali pri 10 izolatih (23, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48 in 49).

Preglednica 7: Rezultati dokazovanja genov za karbapenemaze z metodo PCR.

	Izolat št. 23	Izolat št. 40	Izolat št. 41	Izolat št. 43	Izolat št. 44	Izolat št. 45	Izolat št. 46	Izolat št. 47	Izolat št. 48	Izolat št. 49
KRBaza	KPC	OXA-48	OXA-48	NDM-1	NDM-1	VIM	KPC	OXA-48	KPC	NDM-1

Gen za karbapenemazo smo dokazali 10 izolatov. Med temi so 3 izolati nosili gen za karbapenemazo KPC (razred A), 3 za karbapenemazo OXA-48 (razred D), 3 za karbapenemazo VIM-1 in 1 za karbapenemazo VIM (razred B).

4.2 OSNOVNI ANTIBIOGRAM

V preglednici 8 so prikazani rezultati občutljivosti za testirane karbapeneme.

Preglednica 8: Občutljivost izolatov proti karbapenemom pri disk difuzijski metodi (S = občutljiv, R = odporen, I = zmerno občutljiv).

OBČUTLJIVOST	IMIPENEM (št. izolatov)	ERTAPENEM (št. izolatov)	MEROPENEM (št. izolatov)
Občutljiv (S)	34	11	28
Intermediaren (I)	5	7	6
Odporen (R)	10	31	15
Skupaj	49	49	49

Pri disk difuzijski metodi je bilo proti imipenemu odpornih 10 in intermediarnih 5 izolatov. Proti ertapenemu je bilo odpornih 31 in intermediarnih 7 izolatov. Proti meropenemu jih je bilo 15 odpornih in 6 intermediarnih.

Izmed 49 testiranih izolatov, je bilo:

- 11 izolatov občutljivih za vse tri karbapeneme
- 7 izolatov intermediarnih za ertapenem, pri tem pa občutljivih za imipenem in meropenem

- 8 izolatov odpornih le proti ertapenemu.
- 2 izolata odporna proti ertapenemu in meropenemu.
- 3 izolati intermediarni za imipenem in odporni proti ertapenemu in meropenemu.
- 6 izolatov občutljivih za imipenem, intermediarni za meropenem in odporni proti ertapenemu.
- 2 izolata občutljiva za meropenem, intermediarna za imipenem in odporna proti ertapenemu.
- 10 izolatov odpornih proti vsem trem testiranim karbapenemom.

Glede na dokaz genov za karbapenemaze se rezultati disk difuzijske metode ujemajo pri 8 izolatih (23, 41, 43, 44, 45, 46, 48, 49). Dva izolata, ki imata potrjeno prisotnost karbapenemaze (40 in 47) sta odporna le proti ertapenemu. Proti vsem trem testiranim karbapenemom sta bila odporna tudi 2 izolata, katerma nismo dokazali prisotnosti gena za karbapenemazo.

Ker iz osnovnega antibiograma ne moremo potrditi karbapenemske aktivnosti, smo v nadaljevanju izvedli presejalne in potrditvene metode za dokaz prisotnosti karbapenemaz.

4.3 KULTIVACIJA NA KROMOGENEM ESBL AGARJU IN AGARJU ZA DOKAZOVANJE ENTEROBAKTERIJ, KI IZLOČAJO KARBAPENEMAZE

V preglednici 9 je prikazan končni rezultat kultivacije na obeh kromogenih agarjih. Kultivacijo na kromogenem ESBL agarju smo izvedli za primerjavo, saj naj bi zaradi sestave gojišča na njem enterobakterije, odporne proti karbapenemom, dobro rasle.

Preglednica 9: Rezultati kultivacije na kromogenih gojiščih ESBL in CRE (CPE+ = enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, CPE- = enterobakterije, ki ne izločajo karbapenemaz).

Kromogeno gojišče	Število izolatov		
	CPE+	CPE-	Skupaj
Rast na ESBL in CRE agarju – ujemanje z identifikacijo izolatov	8	20	28
Rast na ESBL in CRE agarju – neujemanje z identifikacijo	0	2	2
Rast samo na ESBL agarju	1	18	19
Rast samo na CRE agarju	0	0	0

Na kromogenem ESBL gojišču so zrasli vsi testirani izolati. Glede na identifikacijo posameznega izolata (v prilogi) se rezultati skladajo pri 45 izolatih. Pri 4 izolatih (3, 28, 35 in 40) se barva kolonij, poraslih na gojišču ni ujemala z identifikacijo izolata. Do lažno pozitivnih rezultatov je prišlo pri 26 izolatih, ki izločajo beta-laktamaze AmpC. To se namreč ne sklada z opisom gojišča, ki naj bi preprečeval rast enterobakterijam, ki izločajo beta-laktamaze AmpC.

Na kromogenem ESBL gojišču so zrasli vsi izolati, katerim smo dokazali gen za prosotnost karbapenemaz. Pri enem izolatu (40) se barva kolonij, poraslih na gojišču ni ujemala z identifikacijo. Enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze na tem agarju dobro rastejo vendar nam sama rast ne pove nič o izločanju karbapenemaze.

Na kromogenem CRE gojišču je izmed 49 testiranih zraslo 30 izolatov. Pri 2 od 30 zraslih izolatov, se barva kolonij ni ujemala z identifikacijo izolatov. Do lažno pozitivnih rezultatov je prišlo pri 21 izolatih. Med 30 poraslimi izolati, jih je 9 imelo dokazan gen za prisotnost karbapenemaze. Izmed izolatov, katerim smo dokazali prisotnost gena za karbapenemazo ni porasel en izolat (47).

4.4 DOLOČITEV MINIMALNIH INHIBITORNIH KONCENTRACIJ ZA IMIPENEM, ETRAPENEM IN MEROPENEM Z METODO DIFUZIJSKEGA GRADIENTA

V preglednici 10 so izmerjene MIK vseh treh karbapenemov (S, I, R) interpretirane glede na smernice CLSI, medtem ko so v preglednici 11 MIK interpretirane glede na smernice EUCAST.

Preglednica 10: Občutljivost izolatov za karbapeneme, glede na izmerjene MIK interpretirane po smernicah CLSI (2013) (IPM = imipenem, ETP = ertapenem, MEM = meropenem, S = občutljiv, R = odporen, I = zmerno občutljiv).

Karbapenem			Bakterijski izolat							Skupaj
IPM	ETP	MEM	<i>C. brakii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
S	S	S	1	3	2	10	2	3	2	23
S	R	S	0	0	1	1	0	0	1	3
S	R	R	0	0	0	0	0	0	3	3
S	I	S	0	0	0	2	0	0	2	4
I	I	S	0	0	0	0	0	1	0	1
S	R	I	0	0	0	0	0	0	4	4
I	R	I	0	0	1	0	0	0	0	1
R	R	I	0	0	0	0	0	0	0	0
R	R	R	0	0	0	1	0	2	7	10

Preglednica 11: Občutljivost izolatov za karbapeneme, glede na izmerjene MIK interpretirane po smernicah EUCAST (2014) (IPM = imipenem, ETP = ertapenem, MEM = meropenem, S = občutljiv, R = odporen, I = zmerno občutljiv).

Karbapenem			Bakterijski izolat							Skupaj
IPM	ETP	MEM	<i>C. brakii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
S	S	S	1	3	2	10	2	3	2	23
S	R	S	0	0	2	3	0	0	6	11
S	R	R	0	0	0	0	0	0	1	1
S	I	S	0	0	0	0	0	1	0	1
I	I	S	0	0	0	0	0	0	0	0
S	R	I	0	0	0	0	0	0	3	3
I	R	I	0	0	0	0	0	1	0	1
R	R	I	0	0	0	0	0	1	1	2
R	R	R	0	0	0	1	0	0	6	7

Določanje občutljivosti se razlikuje glede na to, po katerih smernicah se ravnamo. Če primerjamo CLSI z EUCAST-om, se rezultati v kar nekaj primerih razlikujejo:

- MIK imipenema: izolat 26 je po smernicah EUCAST za imipenem intermediaren, medtem ko je po smernicah CLSI odporen. Izolat 28 je po smernicah EUCAST za imipenem občutljiv, medtem ko je po smernicah CLSI intermediaren.
- MIK ertapenema: dva izolata (6 in 12) sta po smernicah EUCAST odporna proti ertapenemu, med tem ko sta po smernicah CLSI intermediarna. Izolat 20 je po smernicah EUCAST intermediaren za ertapenem, med tem ko je po smernicah CLSI občutljiv.
- MIK meropenema: 6 izolatov (26, 32, 34, 36, 41 in 42) je po smernicah EUCAST intermediarnih za meropenem, med tem ko so po smernicah CLSI odporni. 3 izolati (33, 37, 47) so po smernicah EUCAST občutljivi za meropenem, med tem ko so po smernicah CLSI intermediarni.

Izmed 10 izolatov, katerim smo dokazali gen za karbapenemazo, je 7 izolatov odpornih proti vsem trem testiranim karbapenemom glede na smernice EUCAST in CLSI. 1 izolat, kateremu smo dokazali gen za karbapenemazo (41) je po smernicah EUCAST odporen proti imipenemu in ertapenemu, med tem ko je za meropenem intermediaren. Glede na smernice CLSI je odporen proti vsem trem karbapenemom. 2 izolata (40, 47), katerima smo dokazali gen za karbapenemazo sta odporna le proti ertapenemu. Izolat 40 je občutljiv za imipenem in meropenem tako po smernicah EUCAST, kot po CLSI. Izolat 47 je glede na smernice EUCAST in CLSI občutljiv za imipenem, med tem ko je za meropenem po smernicah EUCAST občutljiv in intermediaren po smernicah CLSI.

4.5 MODIFICIRAN TEST HODGE

V preglednici 12 so predstavljeni rezultati testa MTH.

Preglednica 12: Rezultati MHT testa (CPE+ = enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, CPE- = enterobakterije, ki ne izločajo karbapenemaz, POZ = pozitiven, NEG = negativen).

Število izolatov			
Rezultat MTH	CPE+	CPE-	Skupaj
POZ MHT	9	3	12
NEG MHT	1	36	37

Pozitiven test Hodge smo dobili pri 12 izolatih. Do lažno pozitivnih rezultatov je prišlo pri 3 izolatih, med tem ko je do lažno negativnega rezultata prišlo pri enem izolatu. Rezultati se glede na prisotnost gena za karbapenemazo ujemajo pri 9 izolatih.

4.6 METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRJEVANJE KARBAPENEMAZ

V prilogi so zbrani celotni rezultati testa. V preglednici 13 so glede na rezultate prikazani končni rezultati testa.

Preglednica 13: Končni rezultat metode kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz (CPE+ = enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, CPE- = enterobakterije, ki ne izločajo karbapenemaz).

Število izolatov			
	CPE+	CPE-	Skupaj
POZ TEST	7	0	7
NEG TEST	3	39	42

Pozitiven test smo dobili pri 7 testiranih izolatih. Vsem smo dokazali prisotnost gena za karbapenemazo. Pri 3 izolatih je prišlo do lažno negativnih rezultatov. Do lažno pozitivnih rezultatov pri tem testu ni prišlo.

4.7 TEST Carba NP

V preglednici 14 so prikazani rezultati testa Carba NP.

Preglednica 14: Rezultati metode Carba NP (CPE+ = enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze, CPE- = enterobakterije, ki ne izločajo karbapenemaz).

	Število izolatov		
	CPE+	CPE-	Skupaj
POZ Carba NP	10	0	10
NEG CarbaNP	0	39	39

Pri tem testu ni bilo lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Test je bil pozitiven pri 10 testiranih izolatih, katerim smo dokazali tudi prisotnost gena za karbapenemazo.

4.8 MEHANIZEM ODPORNOSTI ZA VSAK IZOLAT

Preglednica 15 prikazuje koliko izmed testiranih izolatov je imelo določen mehanizem odpornosti.

Preglednica 15: Mehanizmi odpornosti testiranih izolatov, določeni glede na presejalne in potrditvene metode.

Mehanizem odpornosti		Število izolatov
AmpC		26
ESBL		7
AmpC/ESBL		6
A Karbapenemaze	KPC	3
B Karbapenemaze	VIM	1
	NDM-1	3
C Karbapenemaze	OXA-48	3
Skupaj		49

4.9 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST METOD ZA DOKAZOVANJE KARBAPENEMAZ

Preglednica 16 prikazuje specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost za posamezno metodo. Vrednosti so izračunane glede na rezultate, dobljene pri posamezni metodi. Kot zlati standard smo upoštevali dokaz genov za karbapenemaze, določene z metodo PCR.

Preglednica 16: Izračunana specifičnost in občutljivost za metode, ki se lahko uporabljajo za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz.

Metoda		Občutljivost [%]	Specifičnost [%]	Pozitivna napovedna vrednost [%]	Negativna napovedna vrednost [%]
Disk difuzija *		80,0	94,9	80,0	94,9
Disk difuzija **		100,0	46,2	32,3	100,0
MIK *	CLSI	80,0	94,9	80,0	94,9
	EUCAS	70,0	100,0	100,0	92,9
	T				
MIK **	CLSI	100,0	66,7	43,5	100,0
	EUCAS	100,0	61,5	40,0	100,0
	T				
CRE agar		90,0	46,2	30,0	94,7
MHT		90,0	92,3	75,0	97,3
Metoda kombiniranih diskov		70,0	100,0	100,0	92,9
Carba NP		100,0	100,0	100,0	100,0

* Občutljivost in specifičnost sta pri disk difuzijski metodi in določitvi minimalne inhibitorne koncentracije določeni glede na pogoj, da je izolat odporen proti vsem trem testiranim karbapenemom.

** Občutljivost in specifičnost sta pri disk difuzijski metodi in določitvi minimalne inhibitorne koncentracije določeni glede na pogoj, da je izolat odporen proti ertapenemu.

5 RAZPRAVA

Odpornost proti antibiotikom v zadnjih letih predstavlja resno grožnjo javnemu zdravstvu po celem svetu. Okužbe z bakterijami, ki so odporne proti večini antibiotikov, vodijo k podaljševanju bolnišničnega zdravljenja, neuspehu zdravljenja, povečani smrtnosti bolnikov ter povečanju stroškov za zdravstvo. Med takšne bakterije spadajo tudi enterobakterije, odporne proti karbapenemom (Livermore, 2012).

Karbapenemi so zadnji razred antibiotikov za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo po Gramu negativne bakterije, kot sta *K. pneumoniae* in *E. coli*, pogosti povzročitelji pljučnic, okužb sečil in krvi. Odpornost proti karbapenemom je lahko posledica različnih odpornostnih mehanizmov. Odpornost ali zmanjšana občutljivost proti vsaj enemu od karbapenemov je lahko posledica izločanja cefalosporinaz AmpC ali beta-laktamaz ESBL v kombinaciji z izgubo porinov. V zadnjih letih pa se v svetu vse pogostejše pojavljajo bakterije, ki izločajo karbapenemaze. Karbapenemaze predstavljajo najbolj vsestransko družino beta-laktamaz. Večina encimov prepozna vse beta-laktamske antibiotike, pri tem pa so odporni na delovanje skoraj vseh klinično dostopnih inhibitorjev beta-laktamaz. Okužbe, ki jih povzročajo enterobakterije, katere izločajo karbapenemaze imajo omejeno možnost zdravljenja in so povezane z večjo stopnjo smrtnosti. Zato je predvsem za zdravstvene ustanove pomembno vedenje, kako pogosto se pojavljajo proti karbapenemom odporne bakterije (Rao, 2012; Queenan in Bush, 2007).

Na voljo so številni testi za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze, vendar jih je veliko slabo občutljivih in slabo specifičnih, dolgotrajnih, težko izvedljivih, cenovno nedostopnih ali slabo prilagodljivih glede na klinične potrebe. V primeru pojava takšnih bakterij, pa je izbira prave metode, ki bo v kratkem času dala zanesljive rezultate ključnega pomena (Gupta in sod., 2011).

V raziskavi smo s testiranjem 49 kliničnih izolatov enterobakterij želeli določiti najprimernejšo metodo za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz pri enterobakterijah v kliničnih vzorcih, ki bi bila lahko dostopna in izvedljiva v vsakem mikrobiološkem laboratoriju. Želeli smo ovrednotiti občutljivost in specifičnost štirih fenotipskih metod (kultivacija na kromogenem gojišču CRE za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze, modificiran test Hodge, metoda kombiniranih diskov za potrjevanje karbapenemaz, test Carba NP), v primerjavi z molekularno opredeljenim genom za karbapenemaze (PCR metoda). S presejalnima fenotipskima metodama kot sta disk difuzija (osnovni antibiogram) in določitev minimalnih inhibitornih koncentracij za imipenem, ertapenem in meropenem z metodo difuzijskega gradienta smo določili, kateri izmed izolatov bi lahko izločali karbapenemaze.

Izolati enterobakterij so bili osamljeni iz vzorcev odvzetih iz blata bolnikov ter shranjeni v mikrobiološkem laboratoriju na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik ter na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Med 49 testiranimi izolati smo ugotovili karbapenemazno aktivnost pri 10 izolatih enterobakterij. Med temi so 3 sodile v razred A karbapenemaz, 4 v B in 3 v razred D. Iz razreda A so vse 3 sodile v KPC družino, medtem ko so iz razreda D vse 3 sodile v družino OXA-48. Iz razreda B so 3 sodile v NDM-1 in 1 v družino VIM.

Presejalno testiranje občutljivosti izolatov za cefalosporine in karbapeneme lahko nakaže na morebitno prisotnost karbapenemaz. Večino serinskih karbapenemaz lahko ugotovimo v primeru, da so izolati odporni proti ali slabše občutljivi za cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja, karbapeneme in aztreonam, vendar občutljivi za inhibicijo s klavulansko kislino in tazobaktamom. Za metalo beta-laktamaze je značilna zmanjšana občutljivost za cefalosporine z razširjenim spektrom delovanja in karbapeneme ter občutljivost za aztreonam in inhibicijo z EDTA. Karbapenemaze, kot so GES in KPC lahko pri fenotipskih metodah spregledamo, saj je njihovo izražanje šibko. V ta namen smo izvedli disk difuzijo (osnovni antibiogram) in določitev minimalnih inhibitornih koncentracij z metodo difuzijskega gradienta, ki smo ju izvedli po navodilih in interpretacijskih kriterijih CLSI (CLSI, 2013).

Večina izolatov, ki smo jim dokazali prisotnost gena za karbapenemazo, je bilo odpornih proti vsem trem testiranim karbapenemom. Izjema sta bila izolata *E. coli* (40) in *K. pneumoniae* (47), ki sta bila odporna le proti ertapenemu. To ni nenavadno, saj je za karbapenemaze OXA značilna šibkejša hidroliza karbapenemov. Med testiranimi izolati sta bila dva (26 in 42), katerima nismo dokazali gena za karbapenemazo, sta pa bila odporna proti vsem trem karbapenemom. Sklepamo, da je pri teh dveh izolatih prišlo do prekomernega izločanja beta-laktamaz AmpC. Večina izolatov je intermediarnih ali odpornih proti enemu ali dvema od testiranih karbapenemov, kar je značilnost enterobakterij, ki izločajo ESBL ali AmpC v kombinaciji z izgubo porinov. Specifičnost in občutljivost obeh metod sta v našem primeru bili enaki (94,9 % in 80,0 %). Do razlik v specifičnosti in občutljivosti je prišlo v primeru določitve MIK glede na to, po katerih smernicah smo interpretirali dobljene rezultate. V primeru interpretacije rezultatov po smernicah CLSI, je občutljivost znašala 80,0 % in specifičnost 94,9 %, med tem ko je po smernicah EUCAST občutljivost znašala 70,0 % in specifičnost 100 %. Med testiranimi karbapenemi je najboljšo občutljivost za detekcijo karbapenemaz imel ertapenem (100,0 %) za katerega pa je značilna tudi slabša specifičnost. V našem primeru je pri disk difuzijski metodi znašala 46,2 % in pri določitvi MIK 66,7 %.

Naslednja presejalna metoda je bila kultivacija na kromogenem CRE agarju za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze. Metodo smo izvedli po navodilih, ki jih priporoča proizvajalec gojišča (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija). Gojišče vsebuje

koncentracije karbapenemov, ki naj bi omogočale rast le enterobakterijam, ki izločajo karbapenemaze. Na agarju so porasli tudi izolati, ki nimajo karbapenemazne aktivnosti, so pa odporni proti ali intermediarni za enega ali več karbapenemov ter izolati, ki niso odporni proti nobenemu od testiranih karbapenemov. Med tistimi, ki karbapenemazno aktivnost imajo, ni porasel le izolat *K. pneumoniae* z dokazanim genom OXA-48 (47). Možen vzrok bi lahko bila prešibka hidroliza karbapenemov v gojišču, kar je izolatu preprečilo rast.

Cohen Stuart in sod. (2013) so v študiji ugotovili 94 % občutljivost in 71 % specifičnost Brilliance CRE agarja. V naši raziskavi smo pokazali, da ima kultivacija na kromogenem CRE agarju za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze visoko občutljivost (90 %) in nizko specifičnost (46,2 %). Dobra lastnost metode je, da lahko direktno iz kliničnega vzorca ugotovimo prisotnost bakterij, ki so odporne proti karbapenemom. Na kromogenem agarju lahko zrastejo tudi izolati ki izločajo encime v majhnih koncentracijah, kot je npr. karbapenemaza NDM-1. Glede na barvo in velikost kolonij na agarju lahko sklepamo, za kateri bakterijski rod gre. Metoda kot samostojna ni primerna za rutinsko diagnostiko v mikrobiološkem laboratoriju. Lahko se uporablja za presejanje kolonizacije bolnikov z enterobakterijami, ki izločajo karbapenemaze.

Z modificiranim testom Hodge lahko dokažemo prisotnost karbapenemaz, vendar test ne loči med serinskimi in metalo karbapenemazami. Do lažno pozitivnih rezultatov lahko pride zaradi hiperprodukcije beta-laktamaz AmpC. Do lažno negativnih rezultatov lahko pride v primeru, ko imajo karbapenemaze šibko aktivnost. Zato MHT test ni najbolj primeren kot potrditvena metoda. V našem primeru je do lažno pozitivnih rezultatov prišlo pri 3 izolatih (št. 8, 14 in 18) in do lažno negativnih pri enem izolatu (št. 44). Občutljivost MHT je bila v naši raziskavi 90 % in specifičnost 92,3 %. Girlich s sodelavci (2012) je ugotovil 77,4 % občutljivost in le 38,9 % specifičnost metode. Šele po dodatku cinkovih (ZnSO₄) ionov v gojišče, na katerem so izvajali test, sta se občutljivost in specifičnost močno povečali. Kljub temu pa primerjava z ostalimi študijami ni mogoča, saj se odstotki specifičnosti in občutljivosti od študije do študije razlikujejo. Glavne pomanjkljivosti metode so zamudnost, dolgotrajnost in netočnost rezultatov. Velikokrat je interpretacija rezultatov odvisna od posameznika.

Z metodo kombiniranih diskov smo uspešno dokazali prisotnost karbapenemaz pri 7 izolatih enterobakterij: 23 (KPC), 43 (NDM-1), 45 (VIM), 46 (KPC), 48 (KPC), 49 (NDM-1). Pri izolatih, ki izločajo OXA-48 karbapenemaze, le-teh nismo uspeli detektirati z metodo kombiniranih diskov saj zaenkrat še ni dostopnega inhibitorja, ki bi preprečil delovanje OXA-karbapenemaz. Rezultat testa pri enterobakterijah ki izločajo OXA karbapenemaze sicer nakazuje možnost prisotnosti karbapenema, vendar le z uporabo kombiniranih diskov karbapenemaz OXA ne moremo potrditi. Zanje je značilna tudi šibka hidroliza karbapenemov, kar je razvidno iz disk difuzijske metode in metode difuzijskega

gradienta pri katerih smo testirali občutljivost za karbapeneme. Izolata 41 in 47 sta odporna le proti ertapenemu, medtem ko sta proti imipenemu in meropenemu le zmerno občutljiva ali celo občutljiva. V naši raziskavi je bila občutljivost metode kombiniranih diskov za potrditev karbapenemaz 70 % medtem ko specifičnost 100 %. Rezultati so primerljivi z rezultati študije, ki so jo izvedli Giske in sodelavci (2011).

Kot zelo zanesljiva metoda z visoko občutljivostjo (100 %) in specifičnostjo (100 %) se je izkazal test Carba NP. Izvedli smo ga po originalnem protokolu (Nordmann in sod, 2012). Test temelji na *in vitro* hidrolizi imipenema. Le-ta povzroči dvig pH, zaradi česar pride do spremembe barve iz rdeče v rumeno/oranžno. Rezultati te metode so se popolnoma ujemali z rezultati PCR metode. V okviru naše naloge sta specifičnost in občutljivost znašali enako kot je v svoji študiji ugotovil Nordmann s sodelavci (2012). Nekoliko drugačne rezultate so dobili v študiji, ki jo je izvedla Tijet s sodelavci (2013). Občutljivost metode v njihovi študiji je bila le 80 %. Razlike so verjetno rezultat več testiranih izolatov (244), med katerimi je bilo več OXA karbapenemaz, ki le šibko hidrolizirajo karbapenem. Prednost testa sta predvsem hitrost in enostavna izvedba.

PCR metoda predstavlja zlati standard za dokazovanje prisotnosti karbapenemaz. Z njo smo opredelili 10 izolatov enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze. Pri 3 izolatih smo dokazali gen *bla*_{KPC}, pri 3 *bla*_{OXA-48}, pri 3 *bla*_{NDM-1} in pri 1 *bla*_{VIM}. To metodo smo uporabili kot referenčno in na podlagi le-te izračunali specifičnost in občutljivost ostalih metod (tabela 15). Med fenotipskimi potrditvenimi metodami sta najbolj primerljive rezultate s PCR analizo dali Carba NP in metoda kombiniranih diskov za potrditev karbapenemaz. Razlika med njima je, da je test Carba NP hitrejši. Rezultate metode dobimo v 3 urah, medtem ko za metodo kombiniranih diskov rabimo 2 dni. Druga razlika je, da pri Carba NP dokažemo samo karbapenemazno aktivnost, medtem ko pri metodi kombiniranih diskov lahko glede na razlike sinergij določimo tudi razred karbapenemaz. Pri slednji ne moremo dokazati prisotnost karbapenemaz OXA, saj zaenkrat ni ustreznih inhibitorjev, posledica česar je slabša specifičnost metode.

Iz rezultatov študije, lahko zaključimo, da je najbolj specifičen in občutljiv, cenovno najbolj ugoden, hiter in enostaven za izvedbo test Carba NP. V mikrobiološkem laboratoriju bi se dokazovanja enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze lotili z osnovnim antibiogramom. Izolate, ki so odporni ali slabše občutljivi proti kateremu izmed karbapenemov in cefalosporinov 3. generacije, bi testirali s testom Carba NP, s katerim bi v kratkem času potrdili prisotnost/odsotnost karbapenemaz v kliničnem izolatu.

6 SKLEPI

- Med 49 testiranimi izolati enterobakterij, jih je 10 izločalo karbapenemaze. Med temi smo dokazali 3, ki so sodile v razred A, 4 v razred B in 3 v razred D. Iz razreda A so 3 spadale med karbapenemaze KPC, iz razreda B 3 med karbapenemaze NDM-1 in 1 med VIM ter iz razreda D 3 med karbapenemaze OXA-48.
- Določanje odpornosti izolatov enterobakterij proti ertapenemu je 100,0 % občutljiv način in zato najprimernejši kot presejalna metoda za detekcijo karbapenemaz. Zaradi nizke specifičnosti (35,5 %), je treba vse proti ertapenemu odporne izolate enterobakterij pretestirati z metodo, ki zanesljivo potrdi prisotnost karbapenemaz.
- Kultivacija na kromogenem CRE gojišču je dobro občutljiva (90,0 %) in zato primerna kot presejalna metoda vendar se zaradi nizke specifičnosti (46,2 %) ne more uporabljati kot edina metoda za dokazovanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze.
- Glede na specifičnost, občutljivost, zahtevnost in ceno je najboljša metoda za potrjevanje prisotnosti karbapenemaz v rutinskem mikrobiološkem laboratoriju test Carba NP. Sledi ji metoda kombiniranih diskov za potrditev prisotnosti karbapenemaz, s katero lahko določimo tudi družino karbapenemaze.

7 POVZETEK

Odpornost proti karbapenemom je poznana že od samega začetka uporabe karbapenemov. V zadnjem času le-ta vedno bolj narašča, še posebej med enterobakterijami, kar za zdravstvo predstavlja velik problem. Zaradi tega je nadzor nad bakterijami, ki izločajo karbapenemaze v bolnišničnih ustanovah izrednega pomena.

Karbapenemaze so encimi, ki cepijo amidno vez v beta-laktamskem obroču. Zapisi zanje se najpogosteje nahajajo na mobilnih genetskih elementih, kar jim omogoča hitro širjenje med različnimi bakterijskimi vrstami. V Evropi zaenkrat še vedno prevladuje družina KPC, vse pogosteje pa se pojavljajo karbapenemaze iz družin NDM-1 in OXA-48.

Da bi določili najboljšo metodo za dokaz karbapenemaz pri enterobakterijah, smo med seboj primerjali različne metode, ki jih priporočajo evropski in ameriški laboratorijski standardi. Razdelili smo jih na presejalne in potrditvene. Slednje še dodatno na fenotipske in molekularne. Določanje genov za karbapenemaze z verižno reakcijo s polimerazo velja za zlati standard dokazovanja karbapenemaz. Z njo lahko določimo tudi družino encimov. Med 49 testiranimi izolati enterobakterij, smo pri 10 potrdili karbapenemazno aktivnost, med katerimi so bile karbapenemaze iz družin KPC, VIM, NDM-1 in OXA-48.

Z presejalnima metodama, kot sta določitev minimalnih koncentracij za testirane karbapeneme in disk difuzijska metoda smo lahko izločili tiste izolate, ki ne izločajo karbapenemaz. Rezultati med metodama so bili primerljivi. Med potrditvenimi metodami sta bila najuspešnejša test Carba NP s 100 % specifičnostjo in občutljivostjo ter metoda kombiniranih diskov za potrditev prisotnosti karbapenemaz s 70 % občutljivostjo in 100 % specifičnostjo. Odpornost proti karbapenemom je lahko tudi posledica izločanja ESBL in beta-laktamaz AmpC, kar smo potrdili pri vseh ostalih izolatih, ki so bili slabše občutljivi ali odporni proti kateremu od karbapenemov.

Iz rezultatov, pridobljenih v tem magistrskem delu, lahko zaključimo, da je za mikrobiološke laboratorije, ki ne izvajajo rutinskih PCR analiz, najhitrejši, najbolj občutljiv, specifičen in cenovno ugoden test Carba NP. Sledi mu metoda kombiniranih diskov za potrditev prisotnosti karbapenemaz. Časovno je nekoliko daljši, vendar z njim lahko določimo tudi razred karbapenemaz.

8 VIRI

Ambler R.P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, 1036: 321-331.

Amjad A., Mirza I., Abbasi S., Farwa U., Malik N., Zia F. 2011. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian Journal of Microbiology*, 3, 4: 189-193.

Andlovic A. 2002. Enterobakterije. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 179-184.

Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 6: 1211 – 1233.

Bush K., Jacoby G. A. 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3: 969-976.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement Document M100-S23. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 18 str.

Cohen Stuart J., Voets G., Rottier W., Voskuil S., Scharringa J., Van Dijk K., Fluit A.C., Leverstein-Van Hall M. 2013. Evaluation of the Oxoid Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Infectious Disease*, 32, 11: 1445-1449.

EUCAST. 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. Växjö, EUCAST – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 80 str.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf. (januar 2014)

Giske C. G., Martinez-Martinez L., Canton R., Stefani S., Skov R., Glupczynski Y., Nordmann P., Wootton M., Miriagou V., Simonsen G. S., Zemlickova H., Cohen-Stuart J., Gniadkowski M. 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanism and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 1.0. Växjö, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 40 str.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf

Giske C. G., Gezelius L., Samuelsen Ø., Warner M., Sundsfjord A., Woodford N. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology Infection Journal*, 17, 4: 552-556.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. 2012. Value of Modified Hodge Test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 2: 477-479.

Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Eurosurveillance*, 18, 28: pii=2052: 7 str.

Gupta N., Limbago B. M., Patel J. B., Kallen A. J. 2011. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 53, 1: 60-67.

Jones R.N., Biedenbach D.J., Sader H.S., Fritsche T.R., Toleman M.A., Walsh T.R. 2005. Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51, 2: 77-84.

Jacoby G. A. 2009. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*, 22: 161-182.

Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427–438.

Livermore D. M., Woodford N. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? Elsevier Science. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 489-495.

Livermore D. M. 2012. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine*, 27: 128-142.

Marsik F.J., Nambiar S. 2011. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 30, 12: 1094-1095.

Moquet O., Bouchiat C., Kinana A., Seck A., Arouna O., Bercion R., Breurec S., Garin B. 2011. Letters to the editor: Class D OXA-48 Carbapenemase in multidrug-resistant Enterobacteria, Senegal. 2011. Emerging Infectious Disease Journal, 17, 1: 143-144.

Nordmann P., Poirel L., Walsh T.R., Livermore D.M. 2011. The emerging NDM carbapenemases. Trends in Microbiology, 19, 12: 588-595.

Nordmann P., Dortet L. in Poirel L. 2012a. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends in Molecular Medicine, 18, 5: 263-272.

Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C. G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V. 2012b. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clinical Microbiology and Infection, 18, 5: 432-438.

Nordmann P., Poirel L., Dortet L. 2012c. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging infectious diseases, 18, 9: 1503-1507.

Oxoid. 2014. Brilliance CRE agar. Hampshire, Oxoid: 1 str.
<http://www.oxoid.com> (januar, 2014)

Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A., Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 11: 4943-4960.

Parikh R., Mathai A., Parikh S., Sekhar G. C., Thomas R. 2008. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Indian Journal Ophthalmology, 56, 1: 45-50.

Patel G., Bonomo R.A. 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Frontiers in Microbiology, 4: 48, doi: 10.3389/fmicb: 17 str.

Poirel L., Potron A., Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67, 7: 1597-1606.

Pottumarthy S., Moland E.S., Juretschko S., Swanzy S.R., Thomson K.S., Fritsche T.R. 2003. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. Emerging Infectious Disease, 9, 8: 999-1002.

Queenan A.M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clinical Microbiology Review, 20, 3: 440-458.

Rao P. N. 2013. Postgraduate level: Collection of few of my microbiology notes: Carbapenemases. Davangere, Department of Microbiology, Medical College: 12 str.

<http://www.microrao.com/micronotes/pg/carbapenemases.pdf> (december 2013)

Robustillo Rodela A., Díaz-Agero Pérez C., Sanchez Sagrado T., Ruiz-Garbajosa P., Pita López M. J., Monge V. 2012. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. 2012. Eurosurveillance, 17, 7: pii: 20086: 6 str.

Rupp M. E., Fey P. D. 2003. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. Drugs, 63, 4: 353-365.

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.

Tijet N., Boyd D., Patel S.N., Mulvey M.R., Melano R.G. 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57, 9: 4578-4580.

Yu W. L., Ko W. C., Cheng K. C., Chen H. E., Lee C. C., Chuang Y. C. 2008. Institutional spread of clonally related *Serratia marcescens* isolates with a novel AmpC cephalosporinase (S4): a 4-year experience in Taiwan. Diagnostic of Microbiology and Infectious Disease, 61: 460-467.

Walsh T. R., Toleman M. A , Poirel L., Nordmann P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clinical Microbiology Review, 18, 2: 306-325.

Walsh T.R. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. International Journal of Antimicrobial Agents, 36, 3: 8-14.

Walther-Rasmussen J., Høiby N. 2006. OXA-type carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 3: 373-383.

Zeba B. 2005. Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. African Journal of Biotechnology, 4, 13: 1559-1562.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoricama prof. dr. Katji Seme in doc. dr. Viktoriji Tomič, ki sta me kljub prenatrpanemu urniku sprejeli pod svoje mentorstvo, in mi s svojimi nasveti in odgovori na vprašanja pomagali pri nastajanju magistrskega dela.

Hvala tudi Juditi Stokič, ki mi je pomagala pri izvedbi praktičnega dela naloge.

Največja zahvala gre moji družini, ki mi je omogočila študij v Ljubljani in mi tekom študija ves čas stala ob strani ter me spodbujala na moji poti do uspeha.

Hvala Nejcu, za pomoč pri oblikovanju naloge in za vse vzpodbudne besede pri premagovanju ovir na poti do zaključka študija.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ID MALDI-TOF	C. Braakii	C. Freundii	C. Freundii	E. Coli	E. Cloacae	E. Cloacae	E. Asburiae	C. Freundii	E. Cloacae	E. Cloacae
DISK DIFUZIJA										
AM-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CZ-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SXT-25	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
CXM-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CIP-5	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
x										
CTX-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CAZ-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AN-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TZP-110	I	I	I	R	I	R	I	R	R	I
ETP-10	S	S	S	I	S	R	S	I	I	S
x										
IPM-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FEP-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NET-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM-10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATM-30	R	R	I	R	S	R	R	R	R	I
CFM-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MIK										
IPM MIK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETP MIK	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
MEM MIK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KULTIVACIJA NA KROMOGENIH AGARJIH										
ESBL agar	zelene	zelene	modre	modre	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene
CRE agar	NI rasti	NI rasti	NI rasti	rožnate	NI rasti	modre	NI rasti	NI rasti	NI rasti	modre
MHT										
Mod. Hodge test/ERTA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	poz	neg	neg
METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRDITEV KARBAPENEMAZ										
IMI	24,5	25	22,4	22,4	25,5	25,5	23,2	24,7	25,8	23,7
IMI-EDTA	25	25,9	22,4	22,6	26,9	25,5	23,6	24,8	25,9	24,7
SINERGIJA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MERO	29,48	28,38	31,26	30	29,8	28,7	25,8	29,3	27,8	28
MRPBO	29,92	30,17	30,31	31	29,3	30,8	27,3	30,4	29,8	28
MRPCX	30,21	29,99	31,39	30,04	30,5	28,1	26,6	29,5	28,7	28,7
MRPDP	28,65	27,98	29,32	27,8	27,8	27,8	24,1	27,3	26,8	26,3
MERO/PH/DIP	29,88	28,81	30,76	30,8	28,5	28,7	27,8	29,7	27,4	27,2
POZ/NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CARBA NP										
CARBA NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VRSTA KARBAP										
OSTALO	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ID MALDI-TOF	E. Cloacae	E. Cloacae	E. Aerogenes	E. Cloacae	E. aerogenes	K. Pneumoniae	E. Cloacae	E. Asburiae	E. Cloacae	E. Cloacae
DISK DIFUZIJA										
AM-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CZ-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SXT-25	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R
CKM-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM-10	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R
CIP-5	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R
x										
CTX-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CAZ-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AN-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TZP-110	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R
ETP-10	R	R	S	R	S	S	R	R	I	R
x										
IPM-10	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
FEP-30	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R
NET-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
FOX	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
MEM-10	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
ATM-30	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R
CFM-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MIK										
IPM MIK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETP MIK	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
MEM MIK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KULTIVACIJA NA KROMOGENIH AGARJIH										
ESBL agar	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene
CRE agar	modre	modre	NI rasti	NI rasti	NI rasti	ni rasti	modre	NI rasti	NI rasti	modre
MHT										
Mod. Hodge test/ERTA	neg	neg	neg	poz	neg	neg	neg	poz	neg	neg
METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRDITEV KARBAPENEMAZ										
IMI	27	27,7	25,78	24,86	31,1	28,9	27,82	25,04	28,58	29,16
IMI-EDTA	28,2	28,13	26,24	25,58	30,4	22,8	28,33	25,17	29,33	29,49
SINERGIJA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MERO	28,5	28	31	27,8	28,6	28,1	29,8	27,4	27,97	29,6
MRPBO	29,4	30	31,5	29,8	30,2	30,6	28,8	30,8	29,48	31,7
MRPCX	28,9	28,4	31,3	28,9	28,4	30,9	29,9	27,48	29,26	30
MRPDP	27,7	27,9	30	28,9	27,9	32,4	29,5	25,57	27,93	29,5
MERO/PH/DIP	28,5	27,8	30,5	29,6	28,1	31,49	27,8	28,23	28,52	30
POZ/NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CARBA NP										
CARBA NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VRSTA KARBAP										
OSTALO	AmpC	AmpC	AmpC/ESBL	AmpC	AmpC/ESBL	AmpC ESBL	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ID MALDI-TOF	E. Cloacae	K. Pneumoniae	K. Pneumoniae	E. Coli	E. Aerogenes	E. Aerogenes	E. Cloacae	E. Aerogenes	K. Pneumoniae	K. pneumoniae
DISK DIFUZIJA										
AM-10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
CZ-10	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
SXT-25	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R
CXM-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM-10	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
CIP-5	S	R	R	R	S	S	S	S	R	I
x										
CTX-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AMC-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CAZ-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AN-30	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S
TZP-110	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R
ETP-10	S	I	R	S	R	R	I	R	R	R
x										
IPM-10	S	S	R	S	I	R	S	I	S	S
FEP-30	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
NET-30	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
FOX	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM-10	S	S	R	S	R	R	S	R	I	I
ATM-30	R	R	R	S	R	R	R	I	R	S
CFM-5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
MIK										
IPM MIK	S	S	R	S	S	R	S	I	S	S
ETP MIK	S	S	R	S	S	R	S	I	R	R
MEM MIK	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
KULTIVACIJA NA KROMOGENIH AGARJIH										
ESBL agar	zelene	zelene	zelene	modre	zelene	zelene	zelene	rjave	zelene	zelene
CRE agar	Ni rasti	modre	modre	rožnate	rožnate	Ni rasti	modre	rjave	Ni rasti	modre
MHT										
Mod. Hodge test/ERTA	neg	neg	poz	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRDITEV KARBAPENEMAZ										
IMI	28,35	29,17	9 R	29,43	25,29	16,16	26,8	26,35	23,97	26,2
IMI-EDTA	29,07	29,55	17,77	29,86	25,42	19,8	26,99	27,5	24,58	27,4
SINERGIJA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MERO	29,7	31,4	9 R	32,8	27,6	18,6	29,8	31,5	28,5	22,2
MRPBO	31	33,2	22,9	31,7	28,1	26,8	31,5	31,5	28	24,2
MRPCX	30	32,9	9	33	28,7	25	30,7	32	26,8	24,6
MRPDP	29,3	33,4	9	32,9	26,6	18,6	30,3	31,4	26	24,2
MERO/PH/DIP	30,5	32,6	20,2	31,9	27,8	26	30,7	30,8	26,8	26,1
POZ/NEG	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CARBA NP										
CARBA NP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VRSTA KARBAP										
OSTALO	AmpC	AmpC/ESBL	KPC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC	AmpC/ESBL	AmpC

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
ID MALDI-TOF	E. cloacae	K. pneumoniae	K. pneumoniae	K. pneumoniae	E. coli	K. pneumoniae	K. pneumoniae	K. pneumoniae	K. pneumoniae	E. coli
DISK DIFUZIJA										
AM-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CZ-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SXT-25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CXM-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM-10	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R
CIP-5	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S
x										
CTX-30	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC-30	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
CAZ-30	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S
AN-30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TZP-110	I	R	R	R	I	R	R	I	R	I
ETP-10	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
x										
IPM-10	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I
FEP-30	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S
NET-30	S	S	I	S	S	S	I	S	I	S
FOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM-10	S	I	S	S	S	I	I	R	R	S
ATM-30	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S
CFM-5	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
MIK										
IPM MIK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ETP MIK	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM MIK	S	R	I	R	S	R	I	S	R	S
KULTIVACIJA NA KROMOGENIH AGARJIH										
ESBL agar	zelene	zelene	zelene	zelene	sive	zelene	zelene	zelene	zelene	modre
CRE agar	modre	Ni rasti	modre	modre	kremne	modre	modre	modre	modre	rožnate
MHT										
Mod. Hodge test/ERTA	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	-	neg	poz
METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRDITEV KARBAPENEMAZ										
IMI	28,4	25,7	27,4	25,9	24,6	27,7	25,6	15,9	22,9	15,6
IMI-EDTA	29,1	28,6	27,4	28,4	24,6	28,9	25,6	20,2	22,9	20,6
SINERGIJA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MERO	29,2	21,5	22,1	22,8	23,1	21,3	20,5	19,5	19,5	22
MRPBO	29,8	22,3	22,1	22,8	22,3	23,5	20,7	19,8	19,5	25,3
MRPCX	29,9	22,7	22,5	22,7	24,5	20,9	21,4	20,1	17,9	25
MRPDP	28,6	22,9	22,5	22,9	23,2	23,4	20,8	19,9	19,4	24,6
MERO/PH/DIP	30,8	21,2	20,9	23,5	23,3	22,9	21,5	20,2	18,9	24,2
POZ/NEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CARBA NP										
CARBA NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VRSTA KARBAP										
OSTALO	ESBL	AmpC	ESBL	ESBL	ESBL	ESBL	ESBL/AmpC	ESBL	ESBL	ESBL

Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja izolatov enterobakterij za prisotnost karbapenemaz.

ID MALDI-TOF	41 K. pneumoniae	42 E. Aerogenes	43 K. Pneumoniae	44 K. pneumoniae	45 K. pneumoniae	46 K. pneumoniae	47 K. pneumoniae	48 K. pneumoniae	49 E. cloacae
DISK DIFUZIJA									
AM-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CZ-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SXT-25	R	S	R	R	R	S	R	R	R
CXM-30	I	R	R	R	R	R	S	R	R
GM-10	S	S	R	R	S	S	S	S	R
CIP-5	I	S	R	R	R	R	S	R	R
x									
CTX-30	I	R	R	R	R	R	S	R	R
AMC-30	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CAZ-30	S	R	R	R	R	R	S	R	R
AN-30	S	S	R	R	R	R	S	R	R
TZP-110	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ETP-10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
x									
IPM-10	R	R	R	R	R	R	S	R	R
FEP-30	S	S	R	R	R	R	S	R	R
NET-30	S	S	R	R	R	R	S	R	R
FOX	S	R	R	R	R	R	S	R	R
MEM-10	R	R	R	R	R	R	I	R	R
ATM-30	S	R	R	R	S	R	S	R	R
CFM-5	S	R	R	R	R	R	S	R	R
MIK									
IPM MIK	R	R	R	R	R	R	S	R	R
ETP MIK	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MEM MIK	R	R	R	R	R	R	I	R	R
KULTIVACIJA NA KROMOGENIH									
ESBL agar	Zeleno-Modre	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	zelene	Zeleno - modre	zelene
CRE agar	modre	ni rasti	modre	modre	modre	modre	ni rasti	modre	modre
MODIFICIRAN HODGE TEST									
Mod. Hodge test/ERTA	poz	neg	poz	neg	poz	poz	poz	poz	poz
METODA KOMBINIRANIH DISKOV ZA POTRDITEV KARBAPENEMAZ									
IMI	17,4	16,1	9	9	9	11	23,5	9	13
IMI-EDTA	18,4	18,2	24	25,7	24,5	16,1	23,5	14,3	26,3
SINERGIJA	-	-	+	+	+	-	-	-	+
MERO	15,3	16,9	9	9	9	9	21,4	9	9
MRPBO	19,9	21,5	10	9	9	24,3	21,4	19,8	16,6
MRPCX	18	20,8	9	9	9	14,9	21,3	9	9
MRPDP	18	17,5	17,6	21,1	22,1	13	20,6	9	23,9
MERO/PH/DIP	19,3	21,3	19	20,9	22,1	22,8	22,6	19,1	24,3
POZ/NEG	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CARBA NP									
CARBA NP	+	-	+	+	+	+	+	+	+
VRSTA KARBAP	OXA-48		NDM-1	NDM-1	VIM	KPC	OXA-48	KPC	NDM
OSTALO		AmpC							

Se nadaljuje

