

# In vitro učinkovitost topikalnih antimikrobnih lijekova

---

**Zurak, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:820668>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-19**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KRISTINA ZURAK**

***IN VITRO* UČINKOVITOST TOPIKALNIH  
ANTIMIKROBNIH LIJEKOVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Marija Tonkić**

**Split, listopad 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KRISTINA ZURAK**

***IN VITRO* UČINKOVITOST TOPIKALNIH  
ANTIMIKROBNIH LIJEKOVA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Marija Tonkić**

**Split, listopad 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

**Medicinski fakultet Split**

**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**

**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Nastavni predmet:** Farmaceutska mikrobiologija

**Tema rada:** prihvaćena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Fakultetskog Vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** prof. dr. sc. Marija Tonkić, dr. med.

### **IN VITRO UČINKOVITOST TOPIKALNIH ANTIMIKROBNIH LIJEKOVA**

Kristina Zurak, broj indexa 192

#### **Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovoga rada je utvrditi osjetljivost bakterija koje najčešće izazivaju lokalizirane infekcije u KBC Split tijekom 2020. godine na pojedine topikalne antimikrobne lijekove kako bi se ustanovilo koji od testiranih antibiotika je najbolji izbor za empirijsko liječenje ovih infekcija.

**Materijal i metode:** Retrospektivnim istraživanjem analizirani su podaci o osjetljivosti na topikalne antimikrobne lijekove (aminoglikozide, fluorokinolone, kloramfenikol, kolistin te mupirocin) pojedinih vrsta bakterija koje su najčešći uzročnici lokaliziranih infekcija: *Escherichia coli* i ESBL *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (uključujući i ESBL sojeve), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* te *Staphylococcus aureus* (uključujući MRSA). Osjetljivost je ispitivana metodom disk difuzije, a za kolistin metodom dilucije u bujonu.

**Rezultati:** Rezultati pokazuju visoku rezistenciju bakterije *Escherichia coli* na antibiotike ciprofloksacin i levofloksacin, a najmanju na kloramfenikol i kolistin. U usporedbi s *Escherichia coli*, ESBL producirajući soj *Escherichia coli* pokazuje znatno veću rezistenciju na sve ispitivane antibiotike osim na kolistin i kloramfenikol. Sojevi *Klebsiella pneumoniae* su bili najrezistentniji na antibiotik tobramicin, a najmanje rezistentni na kloramfenikol i kolistin. ESBL producirajući sojevi ove bakterije su bili znatno rezistentniji na sve ispitivane antibiotike osim na kloramfenikol i kolistin. *Pseudomonas aeruginosa* je bio najrezistentniji na ciprofloksacin i levofloksacin, a najmanje na kolistin. Sojevi *Acinetobacter baumannii* su bili najrezistentniji na levofloksacin, a najmanje na kolistin. Izolati *Staphylococcus aureus* su bili najrezistentniji na levofloksacin, a najosjetljiviji na kloramfenikol i norfloksacin. MRSA sojevi su bili najviše rezistentni na levofloksacin, u značajno većim postotcima od MSSA sojeva, a najveću osjetljivost pokazali su na mupirocin.

**Zaključak:** Podaci ove studije pokazuju visoke stope rezistencije ispitivanih bakterija na pojedine topikalne antimikrobne lijekove što je u skladu s trendovima porasta rezistencije bakterija u svijetu te možemo pretpostaviti da će se ta rezistencija u budućnosti još povećavati. Stoga su potrebni dodatni naponi i restrikcije koje će omogućiti primjereniju uporabu antibiotika kako bi se spriječilo širenje rezistentnih sojeva.

**Gljučne riječi:** topikalni antimikrobni lijekovi, rezistencija, KBC Split

**Rad sadrži:** 50 stranica, 16 slika, 8 tablica, 26 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Goić Barišić, dr. med., predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Anita Novak, dr. med., član
3. prof. dr. sc. Marija Tonkić, dr. med., mentor

**Datum obrane:** listopad, 2021.

**Rad je utiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**School of Medicine Split**  
**Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy**  
**University of Split, Croatia**

**Scientific area:** Biomedical sciences

**Scientific field:** Pharmacy

**Course title:** Pharmaceutical microbiology

**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8 and by Faculty Council of School of Medicine, session no. 5.

**Mentor:** Marija Tonkić, PhD, Full prof.

### ***IN VITRO* EFFICACY OF TOPICAL ANTIMICROBIAL DRUGS**

Kristina Zurak, index number 192

#### **Summary:**

**Diploma Thesis Title:** *In vitro* efficacy of topical antimicrobial drugs

**Objective:** The main aim of this research was to determine the susceptibility of bacterial isolates which are that most frequent causative agents of localized infections in UHC Split in 2020 to certain topical antimicrobial drugs and to determine which of the antibiotics tested is the best choice for empirical treatment of these infections.

**Material and methods:** In this retrospective study the data of susceptibility to topical antimicrobial drugs (aminoglycosides, fluoroquinolones, chloramphenicol, colistin and mupirocin) of certain types of bacteria that are the most common causes of localized infections were analyzed. Bacterial isolates included were *Escherichia coli* and ESBL *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (including *Klebsiella pneumoniae* ESBL strains), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Staphylococcus aureus* (including MRSA). Sensitivity was examined by disk diffusion method, and for colistin by broth dilution method.

**Results:** The results showed high resistance rates of *Escherichia coli* to the antibiotics ciprofloxacin and levofloxacin, and the lowest rates to chloramphenicol and colistin. Compared with *Escherichia coli*, the ESBL-producing strain of *Escherichia coli* showed significantly higher resistance to all tested antibiotics except colistin and chloramphenicol. Strains of *Klebsiella pneumoniae* were the most resistant to the antibiotic tobramycin, and the least resistant to chloramphenicol and colistin. ESBL-producing strains of this bacterium were significantly more resistant to all tested antibiotics except chloramphenicol and colistin. *Pseudomonas aeruginosa* was most resistant to ciprofloxacin and levofloxacin, and least to colistin. *Acinetobacter baumannii* strains were the most resistant to levofloxacin and the least to colistin. *Staphylococcus aureus* isolates were the most resistant to levofloxacin and the most sensitive to chloramphenicol and norfloxacin. MRSA strains were most resistant to levofloxacin in significantly higher percentages than MSSA strains, and showed the highest sensitivity to mupirocin.

**Conclusion:** The data from this study follow the global trends of increasing resistance, and can be assumed that this number will increase in the future. Restrictions are needed to allow more appropriate use of antibiotics to prevent the spread of resistant strains.

**Keywords:** topical antimicrobial drugs, resistance, University Hospital of Split

**Thesis contains:** 50 pages, 16 figures, 8 tables, 26 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ivana Goić Barišić PhD, Prof., chair person
2. Anita Novak PhD, A/Prof., member
3. Marija Tonkić PhD, Full Prof., supervisor

**Defence date:** October 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mariji Tonkić na pomoći, vodstvu te korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Također velika hvala mojim prijateljima koji su sa mnom sanjali i nadali se do samoga kraja, s kojima sam rame uz rame prolazila i lijepe i teške trenutke studiranja, hvala vam što ste bili moj izvor pozitivnih emocija i što ste uljepšali ovaj period moga života.*

*Najveća hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci, žrtvi i molitvama da bi sve ovo ostvarilo te na strpljenju i vjeri u mene sve ove godine.*



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Topikalni antimikrobni lijekovi.....	2
1.2. Klinička upotreba topikalnih antimikrobnih lijekova.....	5
1.3. Faktori koji utječu na djelotvornost topikalnih antimikrobnih lijekova.....	6
1.4. Faktori koji limitiraju djelovanje topikalnih antimikrobnih lijekova .....	7
1.5. Bakterije koje najčešće izazivaju infekcije za koje se koriste topikalni antimikrobni lijekovi.....	8
1.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.5.2. <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.5.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
1.5.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
1.5.5. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. Ustroj i protokol istraživanja .....	17
3.2. Subjekti istraživanja .....	17
3.3. Intervencije, mjerenja i druga opažanja.....	17
3.4. Statistička analiza .....	21
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1. Osjetljivost gram negativnih bakterija na antibiotike.....	23
4.2. Osjetljivost gram pozitivnih bakterija na antibiotike .....	29
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>41</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>45</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>47</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>49</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. Topikalni antimikrobni lijekovi

Terapija topikalnim pripravcima je široko rasprostranjen i učinkovit način liječenja i prevencije lokalnih infekcija kada se uporaba sistemskih lijekova ne može opravdati i kada njihova uporaba nije sigurna zbog sistemskog djelovanja (1). Postoje oprečna mišljenja o kliničkoj učinkovitosti topikalne antimikrobne terapije naspram alternativne oralne terapije (2).

Prednosti lokalne primjene antimikrobnih lijekova u odnosu na sustavnu primjenu su visoke i trajne koncentracije lijeka prisutne direktno na inficiranom području, mala količina antibiotika koja je potrebna za liječenje, manje sistemskih nuspojava, bolja suradljivost i potencijalno manji rizik za razvoj antimikrobne rezistencije.

Učinak i uspješnost terapije ovisi o topikalnom pripravku koji mora zadovoljavati specifična svojstva s obzirom na anatomiju te mikrobiotu mjesta primjene (3).

Različiti farmaceutski oblici topikalnih pripravaka su:

- čvrsti topikalni oblici: antibiotski praškovi koji sadrže kemijski inertne spojeve kao što su kaolin, talk i cinkov oksid za sprječavanje rasta bakterija kod rana te inhalacija suhim prahom kod plućnih infekcija
- polučvrsti topikalni oblici: kreme, masti, gelovi, paste
- tekući topikalni oblici: nisko do srednje viskozni pripravci za primjenu na neoštećenoj koži (2).

Mehanizmi djelovanja antimikrobnih lijekova su: inhibicija sinteze stanične stijenke, inhibicija funkcije stanične membrane, inhibicija sinteze proteina te inhibicija sinteze nukleinske kiseline bakterija.

Aminoglikozidi su skupina lijekova čiji su predstavnici streptomycin, neomicin, gentamicin, tobramicin i drugi. Propisuju se za ozbiljne gram–negativne infekcije, posebno za *Pseudomonas aeruginosa*. Mehanizam djelovanja je inhibicija sinteze proteina u bakterijskoj stanici vezivanjem na 30S podjedinicu bakterijskog ribosoma i inhibicijom njene funkcije. Svi su aktivniji pri alkalnom pH te su potencijalno ototoksični i nefrotoksični. Najviše se primjenjuju za infekcije koje uzrokuju enterobakterije ili pri sumnji na sepsu.

Postoji više vrsta bakterijskih rezistencija na ovu vrstu lijekova, a najzastupljeniji su nedostatak specifičnog proteinskog receptora na 30S podjedinici ribosoma (modifikacija ciljnog mjesta uzrokovana mutacijama), sposobnost mikroorganizma da stvori adenilaze, fosforilaze i acetilaze koje uništavaju lijekove (plazmidska rezistencija) te promjene u vanjskoj stijenci koja smanjuje aktivni prijenos aminoglikozida u stanicu.

Između tobramicina i gentamicina postoji određena križna rezistencija te su stoga poželjni odvojeni testovi osjetljivosti. Tobramicin ima blago pojačanu aktivnost prema *Pseudomonas aeruginosa* u usporedbi s gentamicinom.

Najčešći topikalni oblici u kojima se primjenjuju ovi antibiotici su kapi za oči, masti, kreme i otopine.

Kloramfenikol je potentni inhibitor sinteze proteina bakterija, a mehanizam djelovanja je blokiranje vezivanja aminokiselina za peptidni lanac na 50S jedinici ribosoma. To je bakteriostatski lijek koji se primjenjuje za liječenje mnogih vrsta infekcija, ali više nije lijek izbora ni za jednu infekciju. Rijetko može uzrokovati aplastičnu anemiju, a u novorođenčadi i nedonoščadi “sindrom sivog djeteta” jer još nije razvijen normalan mehanizam detoksikacije. Mikroorganizmi otporni na kloramfenikol stvaraju enzim kloramfenikol acetiltransferazu, koja poništava djelovanje lijeka, a stvaranje tog enzima kontrolira plazmid (*cat* gen). Najčešće se primjenjuje u obliku kapi za oči i uši.

Polimiksini su bazični kationski polipeptidi koji su nefrotoksični i neurotoksični. Djeluju baktericidno na mnoge gram-negativne aerobne bacile, uključujući *pseudomonas* i seraciju. Vežu se za staničnu membranu bogatu fosfatidiletanolaminom i ometaju njenu funkciju aktivnog prijenosa i permeabilne barijere.

Polimiksin E (kolistin) je postao alternativni lijek za liječenje infekcija uzrokovanih multirezistentnim *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* te kao „terapija spasa“ u slučaju infekcije koju uzrokuje karbapenem rezistentna *Klebsiella pneumoniae*. Mehanizam rezistencije na kolistin može biti posredovan kromosomskim ili plazmidnim genima (*mcr* gen). Pri primjeni ovog lijeka treba biti oprezan zbog toksičnosti. Primjenjuje se u obliku masti i otopina, krema te kapi za oči.

Kinoloni su sintetski analozi nalidiksične kiseline, a mehanizam djelovanja je inhibicija sinteze bakterijske DNA blokiranjem DNA giraze, koja ima ključnu ulogu u replikaciji i popravku DNA. Fluorirani derivati (fluorokinoloni) kao što su ciprofloksacin, norfloksacin te levofloksacin imaju veću antibakterijsku aktivnost i nisku toksičnost u odnosu na prvu generaciju. Vrlo su učinkoviti lijekovi za liječenje infekcija koje uzrokuju enterobakterije, uključujući one rezistentne na treću generaciju cefalosporina, a noviji kinoloni su djelotvorni i protiv anaerobnih bakterija. Kao nuspojave se mogu pojaviti kožni osipi, probavne tegobe, oštećenja jetrene funkcije, ali i oštećenje hrskavice ako su otvorene epifize zbog čega se ne propisuju djeci (4). Primjenjuju se kao kapi za oči, uši ili kao otopine.

Bakterije su razvile mehanizme rezistencije na ove lijekove promjenom ciljnog mjesta djelovanja, odnosno DNA giraze tako da antibiotik ne djeluje na njih. Drugi način je smanjenje propusnosti stanice te također pojačani rad efluksnih pumpi.

Mupirocin je antibiotik koji se sve više koristi za liječenje infekcija koje uzrokuje *Staphylococcus aureus* osjetljiv na meticilin (engl. Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) i *Staphylococcus aureus* rezistentan na meticilin (engl. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (5). To je antibiotik koji proizvodi bakterija koja se nalazi u tlu *Pseudomonas fluorescens*, a inhibira bakterijsku izoleucil t-RNA sintetazu. Mupirocin se brzo metabolizira i postaje neaktivan u tijelu, što ograničava njegovu kliničku uporabu na lokalnu primjenu, prvenstveno nazalnu dekolonizaciju *S. aureus* i impetigo. Primjenjuje se kao 2% krema ili mast.

Pojava rezistencije koja se javila sa širokom uporabom ovog antibiotika postavlja pitanja o kontinuiranoj učinkovitosti i implikacijama za kontrolu infekcije. Smatra se da je mali stupanj rezistencije stafilokoka na mupirocin rezultat točkastih mutacija unutar uobičajenog stafilokoknog gena (*ileS*) koji kodira enzim sintetazu izoleucil t-RNA. Veliki stupanj rezistencije stafilokoka nastaje uslijed djelovanja specifične, plazmidom kodirane sintetaze izoleucil t-RNA (6, 7).

## 1.2. Klinička upotreba topikalnih antimikrobnih lijekova

Upotreba topikalnih antimikrobnih lijekova i dalje je rasprostranjena u kliničkoj praksi zbog navedenih prednosti u odnosu na oralnu terapiju.

Neka od najčešćih stanja kada se primjenjuje lokalna antimikrobna terapija su nekomplikirane infekcije kože (akne, impetigo, dermatitis, folikulitis), opekline i njega rana, infekcije oka, uha, vulvovaginalne infekcije, infekcije donjih dišnih puteva, dentalne infekcije.

Lokalni antimikrobni lijekovi važna su komponenta u liječenju infekcija kože, opekline i njega rana. Suzbijanjem rasta mikroba, pomažu u obnavljanju oštećenih stanica kože. Najčešći uzročnik infekcija kože kao što su impetigo, dermatitis, rozaceja, ekcem, akne te folikulitis je *Staphylococcus aureus*, pogotovo MRSA te *Pseudomonas aeruginosa* koji uzrokuje infekcije opeklina. Topikalni agensi koji se koriste za liječenje ovih infekcija su: mupirocin (2% mast/krema) u liječenju impetiga, infekcije mekih tkiva, njega opeklina i rana, sulfadiazin srebro (1% krema) za njegu opeklina, metronidazol (1% gel/krema) u liječenju rozaceje, fucidinska kiselina (2% krema/mast) u liječenju impetiga, folikulitisa te ekcema, klindamicin (1% otopina) u liječenju akni te mnogi drugi.

Bakterijski konjuktivitis, kronični blefaritis i keratitis su česte infekcije oka za čije liječenje se koriste topikalni antimikrobni lijekovi. Najčešći uzročnici su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* te *Haemophilus influenzae*, a topikalni agensi koji se koriste u liječenju su: kloramfenikol (0,5% kapi), ciprofloksacin (0,3% kapi/mast), gentamicin (0,3% kapi), levofloksacin (0,5% kapi), tobramicin (0,3% kapi) te mnogi drugi.

Dokazano je da su topikalni antimikrobni lijekovi jednako učinkoviti u liječenju infekcija uha kao i oralni antimikrobni lijekovi. Najčešći uzročnici upale uha su *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* te *Streptococcus pneumoniae*, a topikalni lijekovi koje koristimo za liječenje su kloramfenikol (5%, 10% kapi), polimiksin B i bacitracin (mast) te ciprofloksacin, ofloksacin (0,3 % otopina).

Selektivna dekontaminacija probavnog sustava je profilaktička strategija usmjerena na sprječavanje ili smanjenje endogenih infekcija kod kritično bolesnih pacijenata. Režim terapije uključuje kratku primjenu sistemskih antibiotika nakon čega slijedi primjena lijekova poput kombinacije polimiksin E, tobramicin i amfotericin B oralno ili kroz nazogastričnu sondu. Terapija je usmjerena protiv MRSA, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* vrste i mnoge druge bakterije.

Topikalni antimikrobni lijekovi se koriste i za liječenje dentalnih infekcija zbog mogućnosti izravnog otpuštanja lijeka u zahvaćeno tkivo. Najčešće se koristi doksiciklin u obliku gela i tanke trake s tetraciklinom koje se postavljaju između zahvaćenog zuba i tkiva. Lokalni amoksisicilin se koristi u profilaksi bakterijemije i endokarditisa prilikom stomatoloških zahvata.

Prednosti korištenja topikalnih antimikrobnih lijekova kod infekcija donjeg dišnog sustava su lokalizirano djelovanje lijeka na pluća i smanjenje štetnih sistemskih učinaka. Najčešći lijekovi koji se koriste su tobramicin za infekcije uzrokovane s *Pseudomonas aeruginosa* kod cistične fibroze, te aminoglikozidi i polimiksin za liječenje bolničkih pneumonija osjetljivih na navedene lijekove.

Lokalni pripravci metronidazola i klindamicina koriste se za liječenje vulvo-vaginalnih infekcija kao što je bakterijska vaginoza (2).

### **1.3. Faktori koji utječu na djelotvornost topikalnih antimikrobnih lijekova**

Generički slični pripravci ne moraju biti terapijski ekvivalentni, a na djelotvornost i stabilnost topikalnih antimikrobnih lijekova utječu mnogi čimbenici kao što su pH, ionska priroda, viskoznost, izloženost toplini ili svjetlosti, dugotrajno skladištenje te omjeri ulja/vode/tenzida/stabilizatora.

Formulacija pripravka je bitan faktor koji utječe na djelotvornost lijeka te je jednako bitna kao i sama djelatna tvar jer interakcija s površinom kože ili sluznice može promijeniti učinkovitost lijeka.

Formulacija mora osigurati da se antibiotik isporuči na ciljano mjesto, održavajući integritet doze i trajanje terapijske aktivnosti, a najčešće formulacije topikalnih lijekova su čvrsti, polučvrsti i tekući oblici. Distribucija antibiotika također ovisi o upotrijebljenom nosaču i molekularnoj težini lijeka.

Doziranje lijeka i trajanje kontakta s kožom također utječu na učinkovitost topikalne terapije. Poteškoće stvaraju određivanje učinkovite doze i intervala doziranja te procjena lokalne sigurnosti u primjeni topikalnog pripravka zbog manjka metoda za mjerenje stvarne koncentracije lijeka na mjestu primjene. Pacijentove osobne sklonosti te pridržavanje režimu terapije odlučuju o vremenu trajanja liječenja i njegovoj učinkovitosti. Također drugi čimbenici kao znojenje, tjelesna aktivnost i nenamjerno ukljanje lijeka s površine mogu utjecati na učinkovitost.

Reakcija lijeka s drugim fiziološkim komponentama je isto tako bitan faktor djelotvornosti topikalnih pripravaka. Pseudo-eshar je adhezivni sloj eksudata nastao uslijed interakcije upalnih eksudata i proteinskog koaguluma kod upotrebe topikalnih antibiotskih krema za rane, osobito kod dubokih opekline. U takvim slučajevima prednost imaju pripravci s kolagenazom jer su povezani s manjom tvorbom adhezivnog sloja.

Bitan element koji utječe na učinkovitost topikalne terapije su bakterije tankog crijeva koje su povezane s indukcijom citokroma 3A4 kao što imamo slučaj kod rifaksimina koji se koristi za crijevnu dekontaminaciju te time varira koncentracija topikalnih lijekova u crijevima. Kod povećane propusnosti crijeva u slučaju bolesti kao što su mukozitis te portalna hipertenzija također nemamo podatke o stvarno dostupnoj koncentraciji lijeka u crijevima (2).

#### **1.4. Faktori koji limitiraju djelovanje topikalnih antimikrobnih lijekova**

Poteškoće u praćenju doze lijeka i procjena trajanja terapije su bitni faktori koji limitiraju djelovanje topikalnih antimikrobnih lijekova. Stvarne koncentracije lijeka na mjestu primjene je teško izmjeriti. Topikalna terapija se većinom primjenjuje na mjesta s već postojećom bakterijskom florom tako da je teško kontrolirati štetan učinak antibiotika na korisne bakterije. Izlaganje postojeće mikroflore visokoj razini lijeka stvara fenotipove bakterija rezistentne na lijekove (2).



## **1.5. Bakterije koje najčešće izazivaju infekcije za koje se koriste topikalni antimikrobni lijekovi**

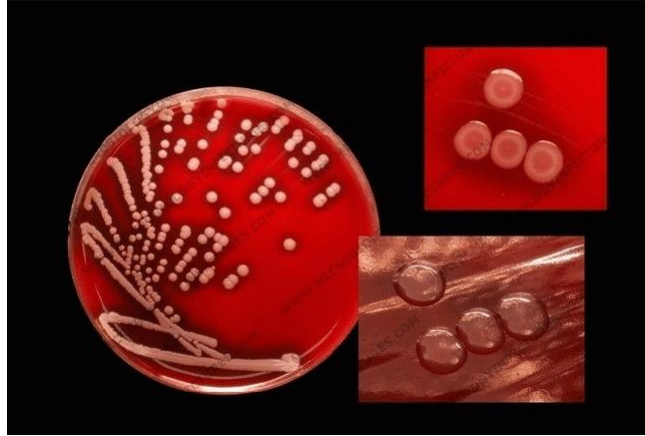
Bakterije koje izazivaju lokalizirane infekcije u liječenju kojih se koriste topikalna antimikrobna sredstva mogu biti gram-pozitivne ili gram-negativne, na temelju mikroskopskog izgleda nakon bojenja po Gramu.

Bojenje po Gramu je jedna od najvažnijih i najčešće korištena tehnika bojenja u mikrobiologiji. To je složeno bojenje koje se temelji na sposobnosti stanične stijenke bakterije da zadrži kristal-violet, ljubičastu boju tijekom tretmana alkoholom. Gram-pozitivni mikroorganizmi imaju veći sadržaj peptidoglikana, dok gram-negativni organizmi imaju veći sadržaj lipida.

Izraz „gram-pozitivan“ označava organizme koji zadržavaju primarnu boju i pod mikroskopom izgledaju plavo-ljubičasto. Organizmi koji ne primaju primarnu boju u bojenju po Gramu već se oboje kontrastnom bojom (karbol fuksin) izgledaju crveno pod mikroskopom i to su gram-negativni organizmi. Gram-negativni organizmi su većinom otporniji na antibiotike zbog prisutnosti vanjske membrane (8).

### **1.5.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* je gram-pozitivna, kuglasta bakterija koja pripada rodu *Staphylococcus* (4). Uobičajeno je dio mikrobiote čovjeka te se nalazi na sluznicama i koži te uzrokuje teže infekcije kada prodre u krvotok i unutarnja tkiva (9). Jedan je od najznačajnijih patogena za čovjeka koji hemolizira eritrocite, koagulira plazmu i stvara različite izvanstanične enzime i toksine. U preparatu većinom formira grozdaste, nepravilne nakupine te producira pigment zlatno žute boje. Na čvrstom hranilištu kolonije su okrugle, glatke, sjajne i uzdignute (Slika 1.). Stafilokoki brzo razvijaju rezistenciju na antimikrobne lijekove što je stalan terapijski problem (4). Najčešće uzrokuje bolničke infekcije kao što su pneumonija, meningitis, empijem, endokarditis ili sepsa s pojavom gnoja u bilo kojem organu (9).



**Slika 1.** *Staphylococcus aureus*, izgled kolonija na krvnom agaru

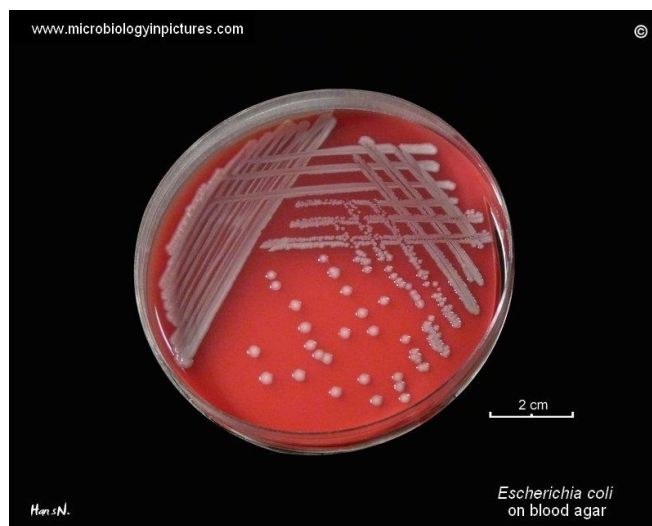
(preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Staphylococcus-aureus-colonies-on-blood-agar\\_fig1\\_332904125](https://www.researchgate.net/figure/Staphylococcus-aureus-colonies-on-blood-agar_fig1_332904125))

MRSA je soj *S. aureus* koji nosi gen *mec* na bakterijskom kromosomu što za posljedicu ima otpornost na mnoge vrste antibiotika kao što su meticilin, nafcilin, oksacilin i cefalosporine, odnosno svi beta-laktamski antibiotici (9). Vodeći je uzrok ozbiljnih bolničkih infekcija te često uzrokuje epidemije (10). Penicilin ostaje lijek izbora za liječenje infekcija koje uzrokuju meticilin osjetljivi izolati stafilokoka, a vankomicin za MRSA sojeve (9).

### 1.5.2. *Escherichia coli*

Porodica *Enterobacteriaceae* je velika heterogena skupina gram-negativnih bacila, a prirodno stanište im je probavni sustav ljudi i životinja. Porodici pripada velik broj rodova među kojima su *Escherichia* i *Klebsiella* (4).

*Escherichia coli* stvara okrugle, konveksne i glatke kolonije s jasnim rubovima (Slika 2.). Najčešći je komenzalni stanovnik gastrointestinalnog trakta i živi na obostranu korist s domaćinom te rijetko izaziva bolest u zdravih ljudi. Unatoč tome, patogeni sojevi su najčešći uzročnici mokraćnih infekcija i dijarealnih bolesti (4,11).



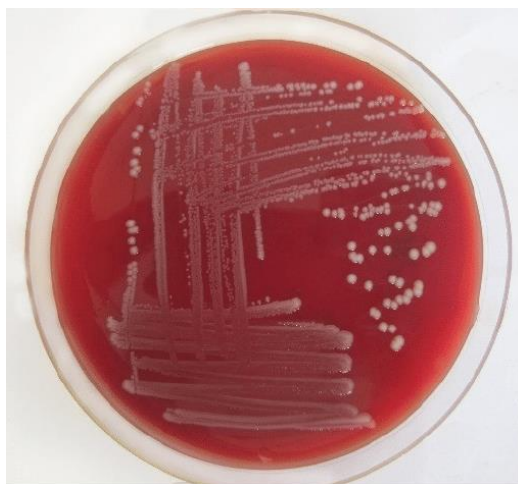
**Slika 2.** *Escherichia coli*, izgled kolonija na krvnom agaru

(preuzeto s <https://microbenotes.com/escherichia-coli-e-coli/>)

Liječenje infekcija koje uzrokuju ove bakterije je danas otežano zbog pojave sojeva koji su rezistentni na brojne antimikrobne lijekove, a glavni mehanizam rezistencije na široki spektar  $\beta$ -laktamskih antibiotika je proizvodnja  $\beta$ -laktamaza. ESBL (*Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*) su enzimi koji imaju sposobnost hidrolize  $\beta$ -laktamskog prstena  $\beta$ -laktama širokog spektra, a najčešće ih proizvode upravo enterobakterije. Geni za ESBL-e se mogu horizontalno prenijeti na druge bakterijske vrste. Ovi enzimi omogućuju otpornost na peniciline i cefalosporine i često su uzrok višestruke rezistencije gram-negativnih bakterija (12).

### 1.5.3. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* je nepokretna bakterija koja stvara velike, vrlo sluzave kolonije (Slika 3.). Prisutna je u fecesu zdravih osoba. Uzročnik je upale pluća, infekcija mokraćnog sustava i bakterijemija te spada među deset najčešćih uzročnika bolničkih infekcija. Smatra se oportunističkim patogenom budući da tipično uzrokuje infekcije u hospitaliziranih ili na neki drugi način imunološki oslabljenih osoba.



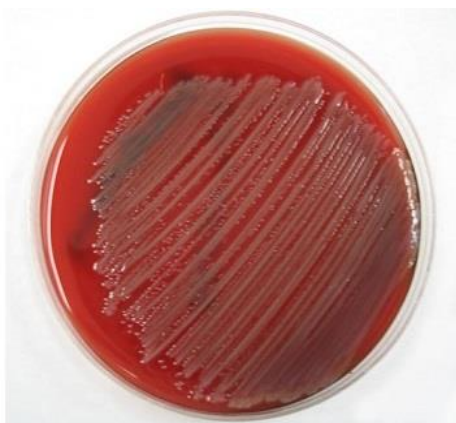
**Slika 3.** *Klebsiella pneumoniae*, izgled kolonija na krvnom agaru

(preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Klebsiella-pneumoniae-showing-non-hemolytic-grey-white-mucoid-colonies-on-sheep-blood\\_fig1\\_271203099](https://www.researchgate.net/figure/Klebsiella-pneumoniae-showing-non-hemolytic-grey-white-mucoid-colonies-on-sheep-blood_fig1_271203099))

Opisano je nekoliko mehanizama rezistencije ove bakterije na antibiotike, pri čemu rezistencija na  $\beta$ -laktame, zbog lučenja ESBL, ima najveći utjecaj na učinkovito liječenje. Karbapenemi su obično lijekovi izbora za liječenje teških infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode ESBL (13).

#### **1.5.4. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je invazivni mikroorganizam koji stvara toksine, izazvajući infekcije u bolesnika s poremećajima imunološkog sustava te je glavni uzročnik bolničkih infekcija. To je gram-negativni, pokretni, aerobni bacil koji stvara okrugle, glatke kolonije s fluorescentnom zelenkastom bojom (Slika 4.). Često je prisutan u malom broju kao dio normalne crijevne flore kao i na koži. Često obitava u vlažnom bolničkom okruženju. Uzrokuje infekcije kože i opekline, meningitis, infekcije urinarnog sustava, nekrotizirajuće pneumonije, upalu vanjskog zvukovoda te sepsu. Otporan je na brojna antimikrobna sredstva te se preporučuje liječenje kombiniranom terapijom penicilina proširenog spektra i aminoglikozida ili liječenje karbapenemima te fluorokinolonima (4).



**Slika 4.** *Pseudomonas aeruginosa*, izgled kolonija na krvnom agaru

(preuzeto s <https://medicoapps.org/m-pseudomonas-aeruginosa/>)

#### **1.5.5. *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* je oportunistički patogen u ljudi koji pretežno izaziva infekcije u teško bolesnih pacijenata. Uzrokuje infekcije kože, mokraćnog sustava, mekih tkiva te sepsu. Aerobna je gram-negativna bakterija kokobacilarne mikromorfologije. Stvara okrugle, sluzave kolonije, glatke površine, pravilnih rubova te sivo-bijele boje (Slika 5.). Može ispoljavati gotovo sve bakterijske mehanizme rezistencije. Sve vrste  $\beta$ -laktamaza otkrivene su u sojevima *Acinetobacter baumannii*, a učestalost izolata rezistentnih na karbapeneme je vrlo visoka (14). Lijek izbora za osjetljive izolate su gentamicin, amikacin, tobramicin, penicilini proširenog spektra i cefalosporini (4). Zbog relativno niske stope rezistencije na kolistin, ovaj lijek se koristi kao posljednje sredstvo za liječenje infekcija koje uzrokuju rezistentni izolati (14).



**Slika 5.** *Acinetobacter baumannii*, izgled kolonija na krvnom agaru

(preuzeto s <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=17067>)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je odrediti *in vitro* osjetljivost izolata bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (uključujući MRSA), *Escherichia coli* te *Klebsiella pneumoniae* (uključujući ESBL sojeve) izoliranih u KBC-u Split na topikalne antimikrobne lijekove (aminoglikozidi, fluorokinoloni, kloramfenikol, kolistin te mupirocin).

Hipoteza je da će u promatranom razdoblju testirani sojevi pojedinih bakterijskih vrsta pokazati visoku stopu rezistencije na specifične ispitivane topikalne antimikrobne lijekove te da takvi lijekovi, za koje se utvrdi visoka stopa rezistencije, nisu najbolji empirijski izbor za liječenje lokaliziranih infekcija. Sojevi bakterija koji produciraju ESBL su rezistentniji na ispitivane topikalne antibiotike od sojeva koji ne luče ESBL. Sojevi MRSA su rezistentniji na ispitivane topikalne antimikrobne lijekove od MSSA sojeva.



### **3. MATERIЈAL I METODE**

### **3.1. Ustroj i protokol istraživanja**

Studija je retrospektivna. Iz baze podataka Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split za razdoblje od 1. siječnja 2020. do 31. prosinca 2020. godine prikupljeni su podaci o sojevima bakterija koje su najčešći uzročnici lokaliziranih infekcija i za koje postoje interpretativni kriteriji kada se testira njihova osjetljivost na topikalne antimikrobne lijekove: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (uključujući MRSA sojeve) te *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* (uključujući sojeve koji luče ESBL). Za navedene sojeve su analizirani rezultati ispitivanja osjetljivosti na sljedeća topikalna antimikrobna sredstva: gentamicin, tobramicin, ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin, kloramfenikol, kolistin te mupirocin.

Istraživanje je započeto prikupljanjem podataka o vrstama gore spomenutih bakterija koje su izolirane u zadanom razdoblju iz uzoraka bolničkih i vanbolničkih pacijenata te pretraživanjem rezultata njihove osjetljivosti na topikalna antimikrobna sredstva. Podaci su uneseni u tablice, za svaku pojedinačnu vrstu, i to ukupan broj izolata testiranih na određeni topikalni antimikrobni lijek, broj osjetljivih te broj rezistentnih izolata. Rezultati su prikazani grafički i tablično te je napravljena završna statistička analiza i izneseno tumačenje rezultata.

### **3.2. Bakterijski sojevi**

U istraživanje su uključeni sojevi navedenih vrsta bakterija izoliranih iz kliničkih uzoraka u KBC-u Split, u razdoblju od jedne godine, od 1. siječnja 2020. do 31. prosinca 2020. godine.

### **3.3. Metode određivanja osjetljivosti bakterija na antimikrobna sredstva**

Za gore navedene sojeve bakterija određivana je *in vitro* osjetljivost na topikalna antimikrobna sredstva, osim kolistina, standardiziranom metodom disk difuzije na Müller-Hinton agaru. Za testiranje osjetljivosti na kolistin korištena je metoda dilucije u bujonu.

Disk difuzija je metoda kod koje se papirnati diskovi natopljeni određenom količinom antibiotika postavljaju na površinu čvrste standardizirane podloge za izradu antibiograma (Müller-Hinton agar). Prethodno je ezom potrebno izabrati kolonije čiste kulture ispitivanog soja te u sterilnoj fiziološkoj otopini pripremiti standardiziranu suspenziju.

Unutar 15 minuta od pripreme suspenzije, sterilni bris se natopi suspenzijom, ocijedi na stijenci epruvete te se tako suspenzija nanese na površinu podloge. Zatim se pomoću sterilne pincete na površinu podloge nanose diskovi antibiotika, pri čemu je minimalna udaljenost između njih 20 mm. Podloga sa diskovima se potom inkubira u termostatu 18-24 sata, pri 35-37 °C. Tijekom inkubacije, antibiotik iz diska difundira u podlogu te, ako je djelotvoran, inhibira rast bakterije. Taj izostanak rasta se zove zonom inhibicije, pri čemu se mjeri njezin promjer te izražava u milimetrima.

Prema veličini promjera zone inhibicije izražene u milimetrima, testirani soj se prema europskim standardima (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST; dostupno na: [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)) svrstava u jednu od tri kategorije:

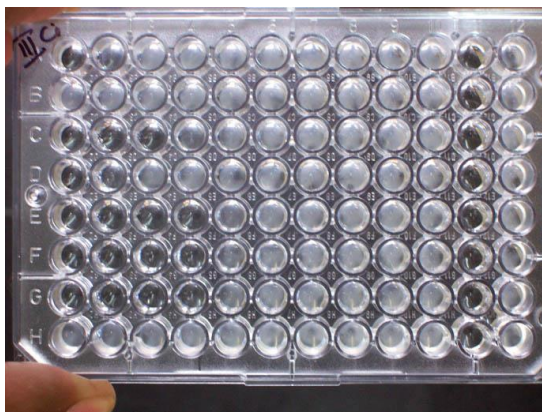
- Osjetljiv (susceptible; oznaka **S**) - soj je podložan terapijskom učinku antibiotika u srednjim ili prosječnim dozama u cijelom organizmu
- Umjereno osjetljiv (intermediate; oznaka **I**) - soj je podložan terapijskom učinku antibiotika u prosječnim dozama samo na mjestima izlučivanja na kojima se koncentrira
- Rezistentan (resistant; oznaka **R**) - antibiotik primijenjen u mogućim netoksičnim dozama ne djeluje na soj (15), (Slika 6.).



**Slika 6.** Metoda disk difuzije na Müller-Hinton agaru za *Staphylococcus aureus*

(preuzeto s <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/disk-diffusion>)

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije kolistina (MIK) napravljeno je metodom dilucije u bujonu na mikrotitar pločicama (Slika 7.).



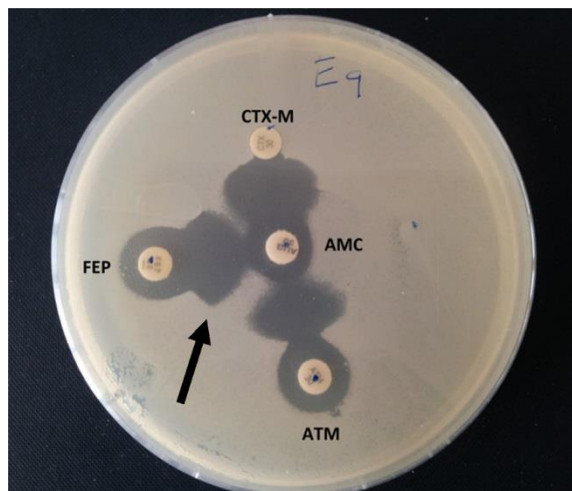
**Slika 7.** Metoda dilucije u bujonu na mikrotitar pločicama

(preuzeto s [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MIC\\_microbroth\\_dilution.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MIC_microbroth_dilution.jpg))

U epruveti sa sterilnom fiziološkom otopinom se najprije napravi suspenzija izolata koji se testira gustoće 0.5 McFarlanda te se ta suspenzija miješa sa određenim koncentracijama kolistina te inkubira u termostatu 16-20 sati, pri temperaturi od 35-37 °C.

Rezultat je najniža koncentracija antimikrobnog sredstva, tj. kolistina, koja inhibira vidljiv rast mikroorganizama i izražena je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), u mg/L ili  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultati su valjani samo ako su ispunjeni sljedeći kriteriji: dovoljan porast, određena zamućenost u pozitivnoj kontroli rasta i ako je prisutna čista kultura bakterija (15).

Za dokaz lučenja ESBL enterobakterija korišten je test s diskom amoksisilina u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom i diskovi koji sadrže samo cefalosporin (cefotaksim, ceftazidim). Pojava proširenja zone inhibicije u području između diska amoksisilina s klavulanskom kiselinom i diska cefalosporina 3. generacije, smatra se dokazom da testirana bakterija luči ESBL (Slika 8.).



**Slika 8.** Test za dokazivanje lučenja ESBL na Müller-Hinton agaru za *Escherichia coli*, pozitivan rezultat

(preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/The-double-disk-synergy-test-performed-on-a-100-mm-Mueller-Hinton-agar-plate-a-clinical\\_fig3\\_282533689](https://www.researchgate.net/figure/The-double-disk-synergy-test-performed-on-a-100-mm-Mueller-Hinton-agar-plate-a-clinical_fig3_282533689))

Otpornost na meticilin sojeva *Staphylococcus aureus* može se fenotipski otkriti metodom disk difuzije korištenjem diska cefoksitina (30  $\mu\text{g}$ ). Ako je promjer zone inhibicije <22 mm soj je rezistentan na meticilin (15).

### **3.4. Statistička analiza**

Podatci su uneseni u programski paket Microsoft Office Excel za izradu tabličnog prikaza te obrađeni u programu Med Calc za Windows, verzija 19.3. Korištene su deskriptivne statističke metode, a kategorijske varijable su izražene apsolutnim brojevima i postocima.

## **4. REZULTATI**

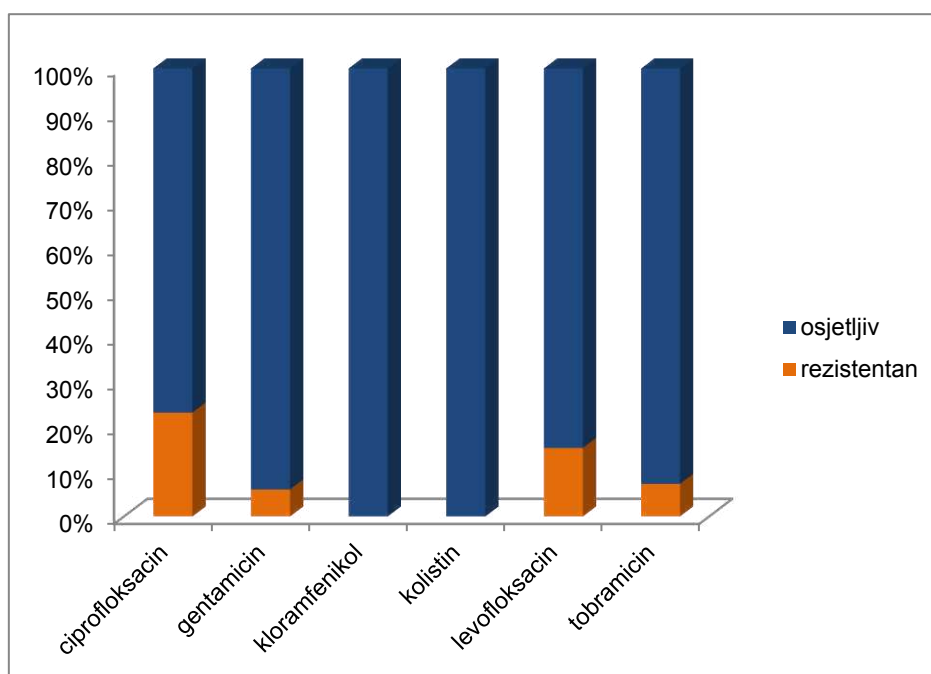
#### 4.1. Osjetljivost gram-negativnih bakterija na antibiotike

##### *Escherichia coli*

U istraživanju su sojevi *Escherichia coli* testirani na sljedeće topikalne antibiotike: ciprofloksacin, gentamicin, kloramfenikol, kolistin, levofloksacin te tobramicin. Rezultati testiranja osjetljivosti na antimikrobna sredstva prikazani su u Tablici 1. i Slici 9.

**Tablica 1.** Osjetljivost sojeva *Escherichia coli* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	2240	1882 (52,77%)	358 (15,98%)
Gentamicin	2218	2084 (93,96%)	134 (6,04%)
Kloramfenikol	2	2 (100%)	0 (0%)
Kolistin	7	7 (100%)	0 (0%)
Levofloksacin	2236	1893 (84,66%)	343 (15,34%)
Tobramicin	137	127 (92,7%)	10 (7,3%)



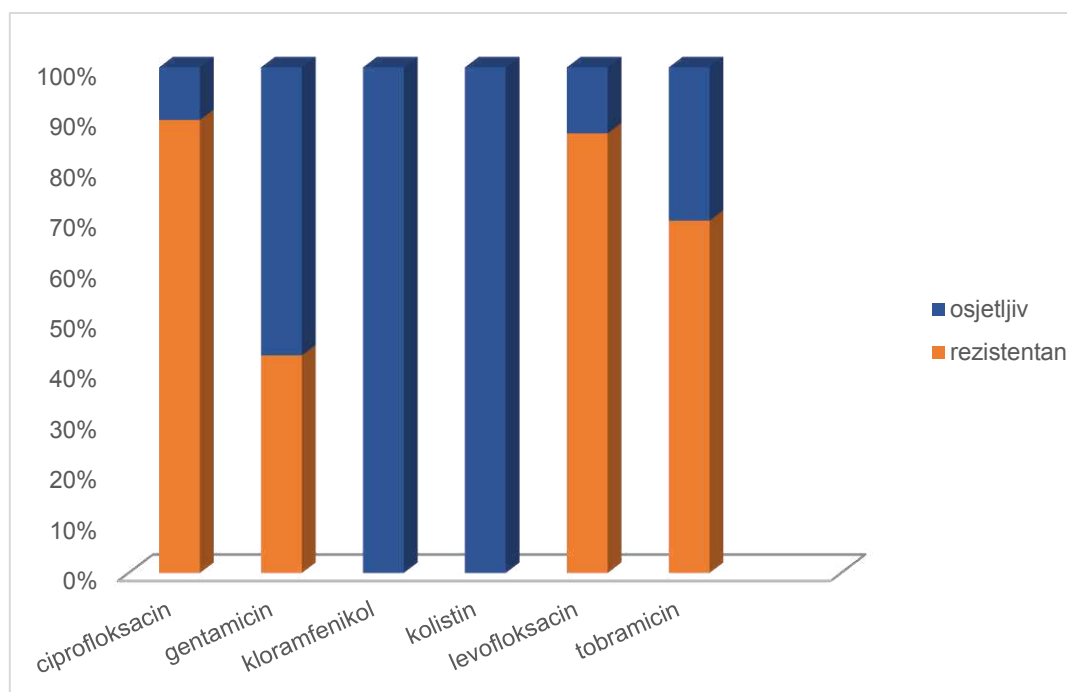
**Slika 9.** Osjetljivost sojeva *Escherichia coli* na antibiotike



Na te iste antibiotike su testirani i sojevi bakterije *Escherichia coli* koji su producirali  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL). Rezultati su prikazani u Tablici 2. i na Slici 10.

**Tablica 2.** Osjetljivost ESBL sojeva *Escherichia coli* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	337	35 (10,39%)	302 (89,61%)
Gentamicin	337	192 (56,97%)	145 (43,03%)
Kloramfenikol	1	1 (100%)	0 (0%)
Kolistin	3	3 (100%)	0 (0%)
Levofloksacin	337	44 (13,06%)	293 (86,94%)
Tobramicin	33	10 (30,3%)	23 (69,7%)



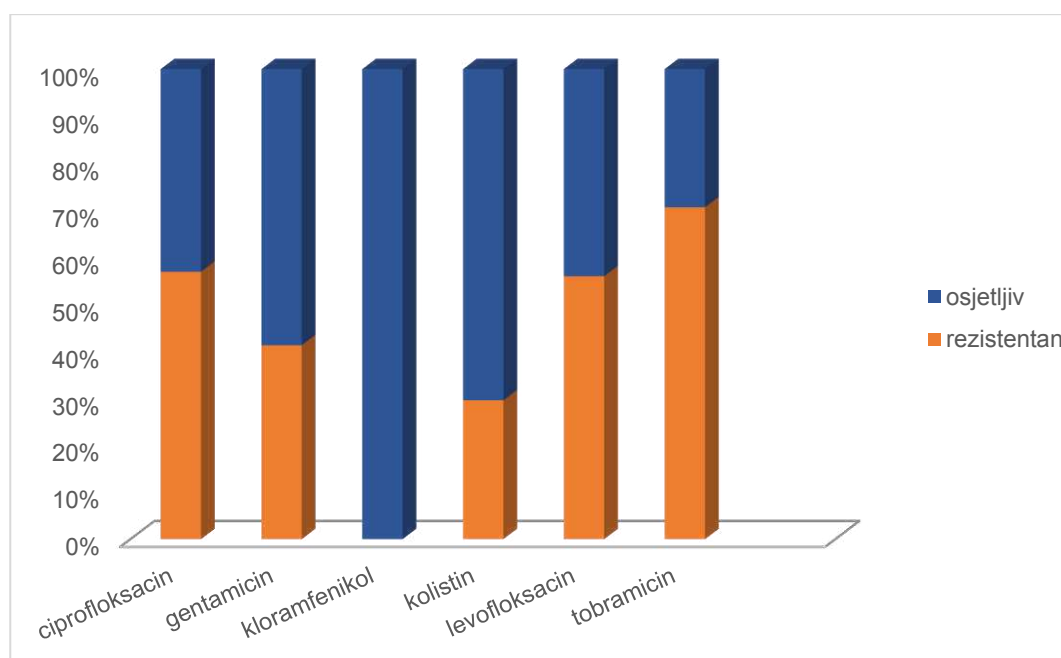
**Slika 10.** Osjetljivost ESBL sojeva *Escherichia coli* na antibiotike

## *Klebsiella pneumoniae*

Tijekom ispitivanog perioda izolati *Klebsiella pneumoniae* su testirani na antibiotike ciprofloksacin, gentamicin, kloramfenikol, kolistin, levofloksacin te tobramicin (Tablica 3. i Slika 11.).

**Tablica 3.** Osjetljivost sojeva *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	929	400 (43,06%)	529 (56,94%)
Gentamicin	914	540 (59,08%)	374 (40,92%)
Kloramfenikol	1	1 (100%)	0 (0%)
Kolistin	314	221 (70,38%)	93 (29,62%)
Levofloksacin	927	408 (44,01%)	519 (55,99%)
Tobramicin	126	37 (29,37%)	89 (70,63%)

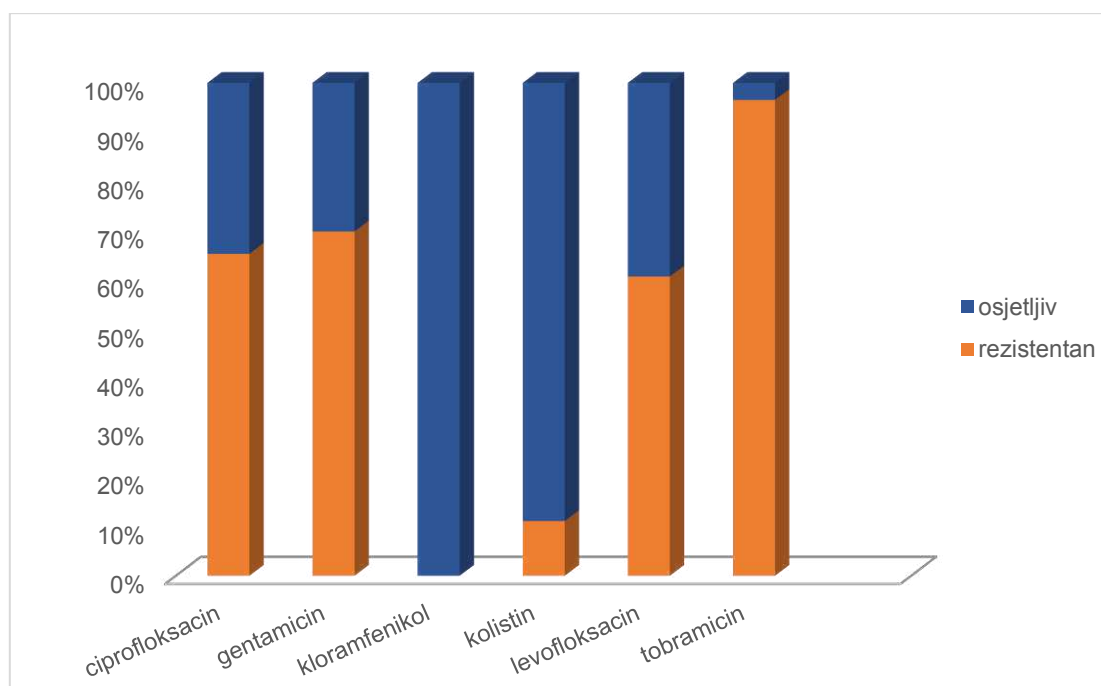


**Slika 11.** Osjetljivost *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike

Također je ispitivana i osjetljivost ESBL sojeva *Klebsiella pneumoniae* na navedene antibiotike što je prikazano u Tablici 4. i na Slici 12.

**Tablica 4.** Osjetljivost ESBL sojeva *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	493	171 (34,69%)	322 (65,31%)
Gentamicin	494	149 (30,16%)	345 (69,84%)
Kloramfenikol	2	2 (100%)	0 (0%)
Kolistin	9	8 (88,89%)	1 (11,11%)
Levofloksacin	496	195 (39,31%)	301 (60,69%)
Tobramicin	29	1 (3,45%)	28 (96,55%)



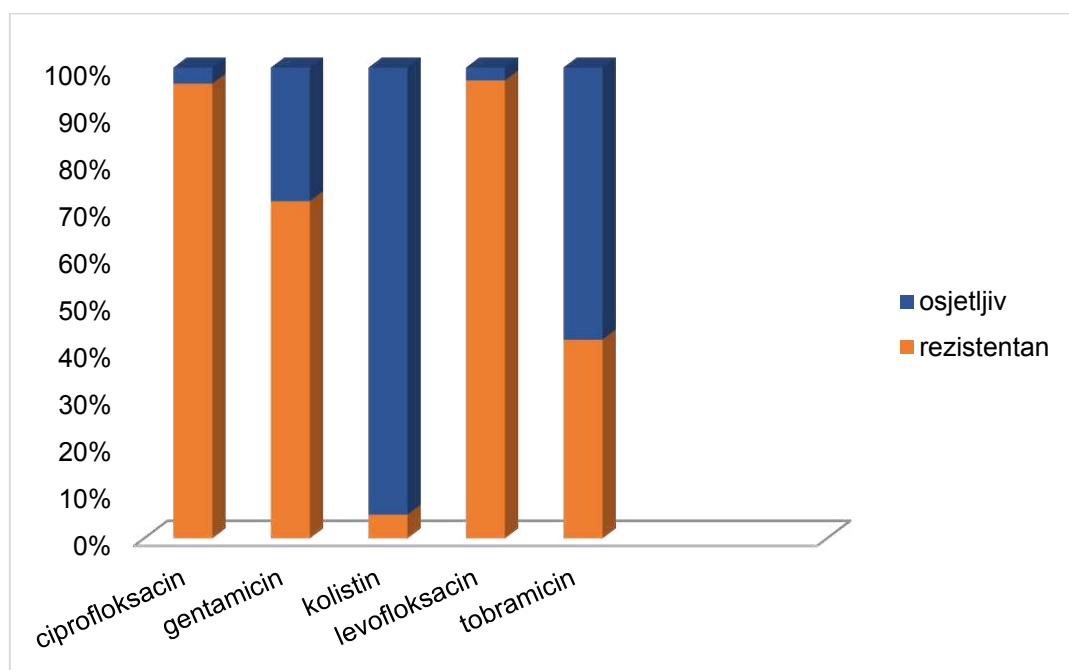
**Slika 12.** Osjetljivost ESBL sojeva *Klebsiella pneumoniae* na antibiotike

### *Pseudomonas aeruginosa*

Sojevi *Pseudomonas aeruginosa* testirani su na ciprofloksacin, gentamicin, kolistin, levofloksacin te tobramicin. Rezultati testiranja osjetljivosti tih sojeva prikazani su u Tablici 5. i na Slici 13.

**Tablica 5.** Osjetljivost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	1297	44 (3,39%)	1253 (96,61%)
Gentamicin	173	50 (28,9%)	123 (71,1%)
Kolistin	197	187 (94,92%)	10 (5,08%)
Levofloksacin	1287	35 (2,2%)	1252 (97,28%)
Tobramicin	690	398 (57,68%)	292 (42,32%)



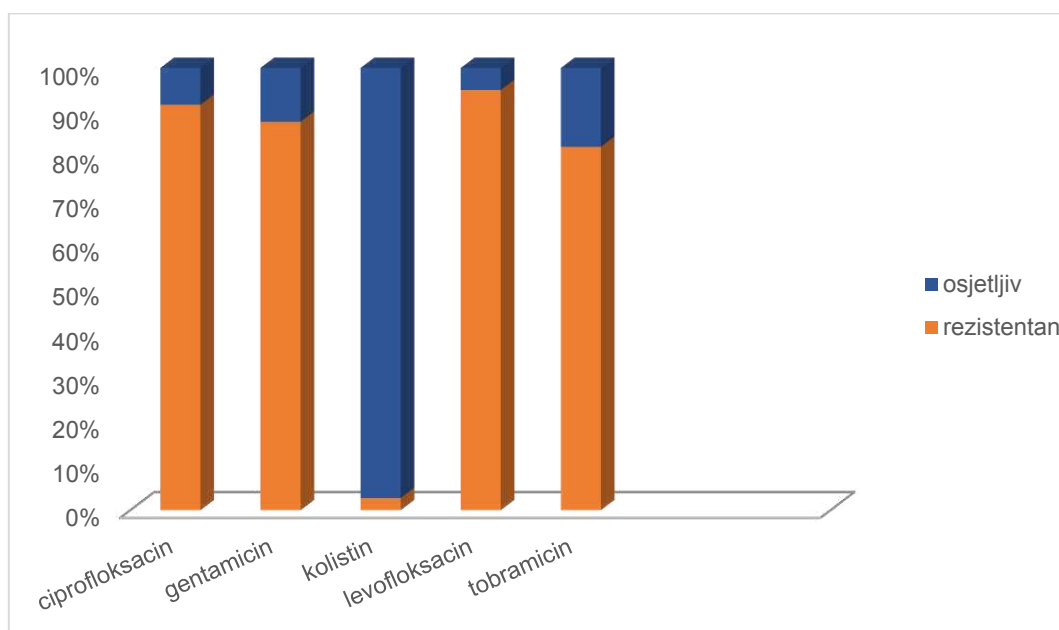
**Slika 13.** Osjetljivost sojeva *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotike

#### *Acinetobacter baumannii*

Sojevi *Acinetobacter baumannii* su testirani na antibiotike ciprofloksacin, gentamicin, kolistin, levofloksacin te tobramicin, a rezultati su prikazani u Tablici 6. i na Slici 14.

**Tablica 6.** Osjetljivost sojeva *Acinetobacter baumannii* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	709	23 (8,32%)	686 (91,68%)
Gentamicin	690	84 (12,17%)	606 (87,83%)
Kolistin	508	494 (97,24%)	14 (2,76%)
Levofloksacin	702	35 (4,99%)	667 (95,01%)
Tobramicin	572	102 (17,83%)	470 (82,17%)



**Slika 14.** Osjetljivost *Acinetobacter baumannii* na antibiotike

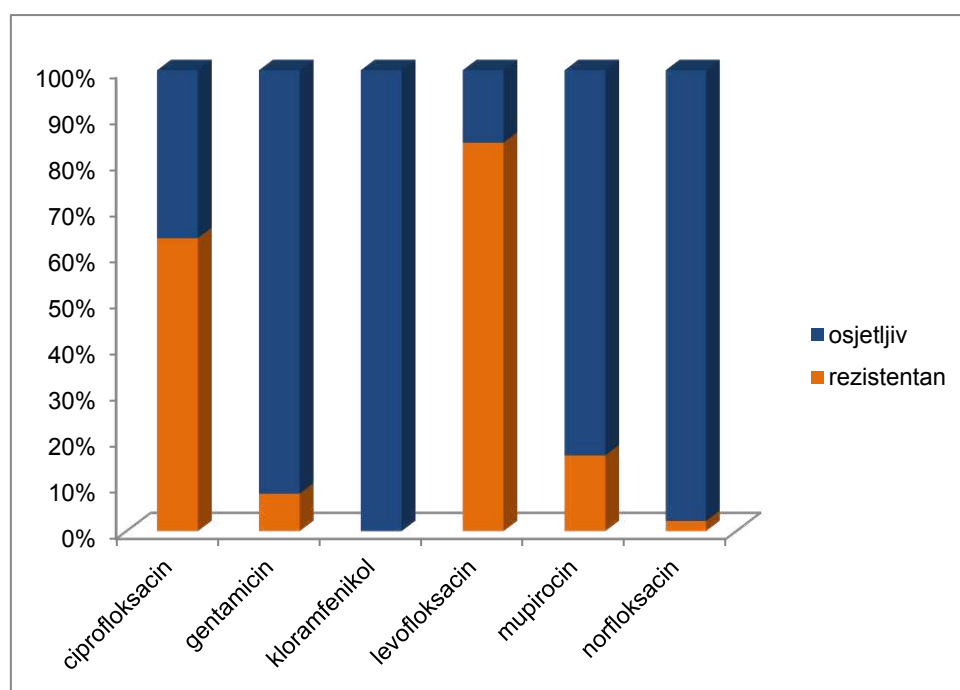
#### 4.2. Osjetljivost gram-pozitivnih bakterija na antibiotike

##### *Staphylococcus aureus*

Izolati bakterije *Staphylococcus aureus* su testirani na ciprofloksacin, gentamicin, norfloksacin, levofloksacin, kloramfenikol te mupirocin a rezultati su prikazani u Tablici 7. i na Slici 15.

**Tablica 7.** Osjetljivost sojeva *Staphylococcus aureus* na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	481	175 (36,38%)	306 (63,62%)
Gentamicin	491	451 (91,85%)	40 (8,15%)
Kloramfenikol	37	37 (100%)	0 (0%)
Levofloksacin	51	8 (15,69%)	43 (84,31%)
Mupirocin	291	243 (83,51%)	48 (16,49%)
Norfloksacin	45	44 (97,8%)	1 (2,22%)

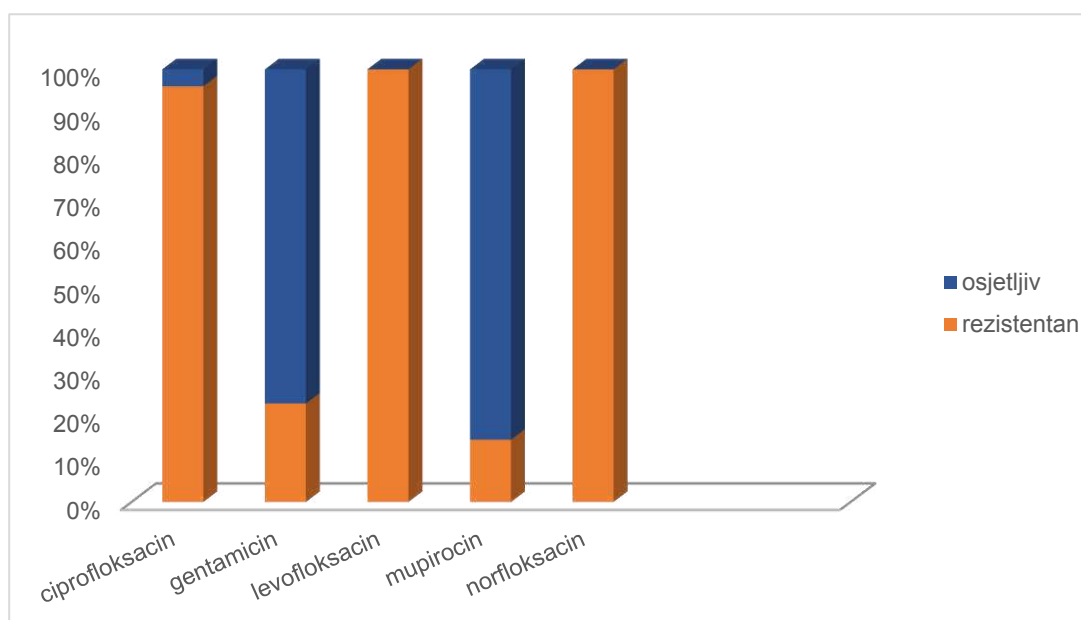


**Slika 15.** Osjetljivost *Staphylococcus aureus* na antibiotike

U Tablici 8. i na Slici 16. prikazana je osjetljivost sojeva MRSA (Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*) na testirane antibiotike.

**Tablica 8.** Osjetljivost sojeva MRSA na antibiotike

Ispitivani antibiotici	Ukupan broj sojeva (n)	Osjetljivo (n, %)	Rezistentno (n, %)
Ciprofloksacin	154	6 (3,9%)	148 (96,1%)
Gentamicin	158	122 (77,22%)	36 (22,78%)
Levofloksacin	7	0 (0%)	7 (100%)
Mupirocin	125	107 (85,6%)	18 (14,4%)
Norfloksacin	12	0 (0%)	12 (100%)



**Slika 16.** Osjetljivost MRSA na antibiotike

## **5. RASPRAVA**



U ovom istraživanju proučavana je *in vitro* osjetljivost bakterija izoliranih iz kliničkih uzoraka pacijenata u KBC Split koji su imali lokalizirane infekcije na topikalne antimikrobne lijekove u jednogodišnjem razdoblju.

Velika upotreba antibiotika u posljednjih pedeset godina je selektivnim pritiskom potaknula preživljavanje sojeva rezistentnih na brojne antibiotike, a taj problem je danas sve izraženiji (16).

Mnogo puta je naglašeno koliko je važno imati na raspolaganju učinkovite antibiotike te je u brojnim radovima izražena velika zabrinutost zbog sve veće rezistencije bakterija na antibiotike. Kada nemamo na rasplaganju učinkovite antibiotike, zarazne bolesti postaju sve veći problem, a to onda dovodi do povećanog morbiditeta, češćeg korištenja zdravstvene zaštite i prerane smrtnosti (16).

Antimikrobna rezistencija (AMR) je prirodna pojava koja se javlja kada su mikroorganizmi izloženi antimikrobnim lijekovima. Djelovanjem selektivnog pritiska antibiotika, osjetljive bakterije se uništavaju ili inhibiraju, dok bakterije koje su prirodno (ili intrinzički) rezistentne ili koje su postale rezistentne na antibiotike imaju veće šanse za preživljavanje i razmnožavanje. Ne samo prekomjerna upotreba antibiotika, već i neodgovarajuća upotreba (neodgovarajući izbor, neodgovarajuće doziranje, loše pridržavanje smjernica za liječenje), doprinose povećanju rezistencije na antibiotike (17).

U 2019. godini Europskom centru za prevenciju i kontroli bolesti (ECDC) najveći je postotak prijavljenih rezistentnih sojeva na određenu vrstu antibiotika bio za bakterije *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Postotci rezistencije bili su veći za *Klebsiella pneumoniae*. Po prikupljenim podacima centra, veći postotci rezistencije zabilježeni su za zemlje na jugu i istoku Europe, nego na sjeveru (18).

*Escherichia coli* je jedna od najviše proučavanih i najraširenijih bakterija današnjice kod koje je rezistencija sve više izražena. Posljednja dva desetljeća svjedočimo velikom porastu širenja rezistencije sojeva *E. coli* na velike klase antibiotika poput  $\beta$ -laktama, kinolona, aminoglikozida, sulfonamida i drugih. Nažalost, ta se rezistencija proširila na posljednje klase antibiotika kao što su polimiksini i karbapenemi (19,20).

Kako je prikazano u ovom istraživanju, rezistencija ove bakterije bila je najveća na ciprofloksacin (15,98% rezistentnih od 2240 testiranih sojeva) i levofloksacin (15,34% od 2236 soja), nešto manja na gentamicin (6,04% od 2218 sojeva) i tobramicin (7,30% od 137 sojeva), a najmanja na kloramfenikol (0% od 2 ispitivana soja) i kolistin (0% na 7 ispitivanih sojeva).

Istraživanje Europske agencije za prevenciju i kontrolu bolesti od 2015. do 2019. godine pokazuje trend smanjenja rezistencije sojeva *Escherichia coli* na fluorokinolone (ciprofloksacin i levofloksacin), a u 2019. godini u Europi je od 160 692 izolata, 23,8 % bilo rezistentno na fluorokinolone. Hrvatska pokazuje porast rezistencije na ovu vrstu antibiotika u 2019. godini gdje je od 1108 sojeva 27,3% bilo rezistentno na fluorokinolone te se ubraja u zemlje s rezistencijom od 25% do <50%.

Rezistencija na aminoglikozide (gentamicin i tobramicin) za 2015.-2019. godinu u Europi i Hrvatskoj pokazuje trend pada. U 2019. godini u Hrvatskoj je od 1112 izoliranih sojeva, 14,8 % bilo rezistentno na aminoglikozide (18).

Podaci prikupljeni našim istraživanjem za 2020. godinu pokazuju manje stope rezistencije za fluorokinolone i aminoglikozide u odnosu na izvješće ECDC-a za razdoblje od 2015.-2019. godine.

Intrinzičkoj rezistenciji *Escherichia coli* doprinosi njezina vanjska membrana, koja je nepropusna za mnoge molekule, te ekspresija brojnih pumpi, koje učinkovito smanjuju unutarstaničnu koncentraciju određenih antibiotika (20).

Sojevi *Escherichia coli* koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL) su globalna prijetnja za javno zdravlje. Otporni su na brojne klase antibiotika, što rezultira ograničenim terapijskim mogućnostima za liječenje infekcija uzrokovanih tim patogenima. Horizontalni prijenos gena razmjenom plazmida između sojeva ove bakterije poznati je izvor brzog širenja rezistencije na antimikrobne lijekove (19).

Sojevi *Escherichia coli* koji luče  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra, u ovom istraživanju također nisu bili rezistentni na kloramfenikol (1 analiziran soj) i kolistin (3 soja), ali analiziran je vrlo mali broj sojeva. Najveća rezistencija je zabilježena na ciprofloksacin (89,61% od 337 sojeva) i na levofloksacin (86,94% od 337 sojeva).

Na aminoglikozide je stopa rezistencije nešto niža u usporedbi s kinolonima pa je za tobramicin bila 69,70%, a na gentamicin 43,03 %.

Ako usporedimo sojeve *Escherichia coli* koji ne produciraju ESBL s ESBL *Escherichia coli* možemo uočiti značajno veću rezistenciju ESBL sojeva *E. coli* na ciprofloksacin, levofloksacin, gentamicin te tobramicin. Nije bilo razlike u osjetljivosti na kolistin i kloramfenikol, ali na te antibiotike je testiran mali broj izolata. Ovi podaci ukazuju na to da ispitivani aminoglikozidi i kinoloni ne bi bili dobar terapijski izbor u liječenju infekcija koje uzrokuju sojevi ESBL *Escherichia coli*.

*Klebsiella pneumoniae* je uobičajena crijevna bakterija koja može uzrokovati infekcije opasne po život. Rezultati ove studije pokazali su da su sojevi *K. pneumoniae* najviše rezistentni na tobramicin (70,63% od testiranih 126 sojeva), zatim slijedi ciprofloksacin (56,94% od 929 sojeva) te levofloksacin (55,99% od 927 sojeva). Od 914 testiranih sojeva, 41% je bilo rezistentno na gentamicin, a na kolistin 29,62% od 314 ispitivanih sojeva.

Podaci ECDC-a za razdoblje od 2015.-2019. godine pokazuju trend porasta rezistencije bakterije u Europi, kao i u Hrvatskoj na fluorokinolone, a pad rezistencije na aminoglikozide. U Europi je za 2019. godinu rezistencija na fluorokinolone bila 31,2% od 41 330 testiranih sojeva, a u Hrvatskoj 57,9% od 318 sojeva. Rezistencija na aminoglikozide za istu godinu u Hrvatskoj je bila 42,8% od testiranih 325 sojeva.

Rezultati ovog rada za 2020. godinu se značajno ne razlikuju od navedenog izvješća u Europi, ali se izdvaja jedino tobramicin s visokim postotkom rezistencije od 70,63%.

U ovom istraživanju je pokazano da je ESBL *Klebsiella pneumoniae* znatno rezistentnija na ispitivane antibiotike u odnosu na sojeve *Klebsiella pneumoniae* koji ne luči ESBL. Tako je na tobramicin bilo rezistentno 96,55% od testiranih 29 sojeva, na ciprofloksacin 65,31% od 493 sojeva, na gentamicin 69,84% od 494 sojeva te na levofloksacin 60,69% od 496 sojeva. Rezistencija na kolistin je bila niska (11,11% od 9 ispitivanih sojeva), a nije zablježena rezistencija na kloramfenikol (0% od 2 soja), uz napomenu da je na ove antibiotike testiran uistinu mali broj sojeva.

Kolistin je danas posebno važan kao sredstvo za liječenje po život opasnih infekcija koje uzrokuju enterobakterije rezistentne na karbapeneme (21).

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* koristi brojne mehanizme rezistencije na antibiotike. Neki od mehanizama su: smanjenje propusnosti vanjske membrane, ekspresija efluks pumpi koje izbacuju antibiotike iz stanice i proizvodnja enzima koji inaktiviraju antibiotike. Stečena rezistencija može se postići horizontalnim prijenosom gena rezistencije ili mutacijskim promjenama (22).

Ova bakterija pokazuje rezistenciju na veliki broj antimikrobnih sredstava uključujući  $\beta$ -laktame, fluorokinolone, tetraciklin i aminoglikozide (23).

Prema podacima ovog istraživanja najveća rezistencija sojeva *P. aeruginosa* je zabilježena na fluorokinolone, levofloksacin (97,28 od testiranih 1287 sojeva) te ciprofloksacin (96,61% od 1297 sojeva). Na aminoglikozide je rezistencija bila nešto manja pa je na gentamicin iznosila 71,10% (od testiranih 173 soja), a na tobramicin 42,32% (od testiranih 690 sojeva). Najbolju učinkovitost je pokazao kolistin s rezistencijom od samo 5,08% na 197 ispitivanih sojeva.

Prema prikupljenjim podacima ECDC-a za razdoblje od 2015. do 2019. godine, rezistencija *P. aeruginosa* na fluorokinolone i aminoglikozide je u Hrvatskoj bila u padu. Za 2019. godinu rezistencija na fluorokinolone je bila 29,8 % od 181 testiranog uzorka ove bakterije, a na aminoglikozide 20,2 % na 183 uzorka *P. aeruginosa*.

Najmanja stopa rezistencije zabilježena je za kolistin što je usporedivo s rezultatima naše studije gdje na većinu antibiotika ova bakterija pokazuje rezistenciju u puno većim postotcima u usporedbi s istraživanjima ECDC-a, osim na kolistin. Kolistin se koristi za liječenje infekcija koje uzrokuje *Pseudomonas aeruginosa* zbog multirezistentnih profila mnogih sojeva, što znači da ne postoje alternativni antibiotici koji bi se mogli propisati (24).

*Acinetobacter baumannii*, multirezistentni patogen koji uzrokuje bolničke infekcije, prema rezultatima prikazanim u ovom radu, je dobro osjetljiv jedino na kolistin - stopa rezistencije je 2,76%. Rezistencija na kinolone je visoka tako da je na ciprofloksacin rezistentno 91,68% od 709 testiranih sojeva, a na levofloksacin 95,01% od testirana 702 soja. Rezistencija na aminoglikozide je također visoka te je na gentamicin bilo rezistentno 87,83% od 690 testiranih sojeva te na tobramicin 82,17% od testirana 572 soja.

Izvješće ECDC-a za razdoblje od pet godina pokazuje pad rezistencije sojeva *A. baumannii* na fluorokinolone te blagi porast rezistencije na aminoglikozide u Europi. U Hrvatskoj je 2019. godine rezistencija na kinolone bila 93,7% na 142 ispitivana soja ove bakterije, a na aminoglikozide 92,15% na testiranih 140 sojeva. Prema našim podacima vidljiv je pad rezistencije na aminoglikozide za 2020. godinu u odnosu na podatke ECDC-a za Hrvatsku iz 2019. godine.

Kolistin i tigeciklin ostaju jedini antibiotici aktivni protiv bakterije i postali su posljednje utočište u liječenju *Acinetobacter baumannii* rezistentnog na više lijekova (MDR).

Jedina analizirana gram-pozitivna bakterija, *Staphylococcus aureus*, koji je dio mikrobiote čovjeka, osobito kožne flore i često je uzročnik infekcija, prema rezultatima ovog istraživanja bio je najviše rezistentan na kinolone i to na levofloksacin (84,31% rezistentnih sojeva od 51 testiranog) i ciprofloksacin (63,62% od 481 soja). Dosta niža stopa rezistencije je zabilježena na mupirocin (16,49% od 291 testiranog soja) te gentamicin (8,15% od 491 soja). Najbolja učinkovitost, s najmanjim postotkom rezistencije, je bila na norfloksacin (2,22% od 45 sojeva) te na kloramfenikol (0% od 37 sojeva).

Istraživanje provedeno u Kanadi u razdoblju od 2007. do 2018. godine pokazalo je da 31,8% od ukupno testirana 422 soja *S. aureus* je bilo rezistentno na ciprofloksacin, a na mupirocin 1,4%, tako da stope rezistencije su u tom kanadskom istraživanju bile manje za navedeno razdoblje i navedene antibiotike u odnosu na naše istraživanje (25).

Antibiotik mupirocin se sve više koristi za dekolonizaciju *Staphylococcus aureus* radi sprječavanja hospitalnih infekcija, međutim, povećana upotreba ovih sredstava dovela je do rasta stope rezistencije i smanjene učinkovitosti.

Dekolonizacija se odnosi na postupak uklanjanja jednog ili više patogena iz tijela upotrebom biocidnih sredstava. Strategije dekolonizacije mogu biti usmjerene na kolonizirane pacijente ili se mogu dati univerzalno svim pacijentima.

Mupirocin mast se koristi lokalno (tipično 2% koncentracija, primijenjena intranazalno dva do tri puta dnevno tijekom 5-7 dana) za dekolonizaciju *Staphylococcus aureus*. Zanimanje za dekolonizaciju dodatno je raslo kako je prevalencija MRSA sojeva *S. aureus* dramatično porasla u bolnicama, a zatim i u vanbolničkoj sredini diljem svijeta (5).

Razvoj rezistencije na mupirocin povezan s njegovom širokom upotrebom, pogotovo za liječenje infekcija kože i mekog tkiva, sve je više prisutan te je potrebno razumno ograničiti uporabu ovog lijeka za indikacije bez utvrđene koristi ili upotrebu bez recepta (5).

*Staphylococcus aureus* otporan na meticilin je glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u cijelom svijetu te je smrtnost od MRSA infekcija dvostruko veća od smrtnosti sličnih infekcija uzrokovanih meticilin osjetljivim sojevima zbog odgođenog adekvatnog liječenja (16).

Ovim istraživanjem utvrđena je najveća rezistencija MRSA na ciprofloksacin (96,10% rezistentnih sojeva od 154 testirana soja), levofloksacin (100% od 7 sojeva) te na norfloksacin (100% od 12 sojeva) čime možemo zaključiti da kinoloni nisu lijekovi izbora za liječenje infekcija uzrokovanih ovom bakterijom. Testirani sojevi MRSA su pokazali najmanju rezistenciju na gentamicin (22,78% od 158 sojeva) te mupirocin (14,4% od 125 sojeva).

Pri usporedbi MSSA i MRSA sojeva uočljiv je značajno veći postotak rezistencije MRSA na sve ispitivane antibiotike, osim na mupirocin gdje je vidljiv blagi pad stope rezistencije MRSA u odnosu na MSSA soj.

Izvješće ECDC-a za razdoblje od pet godina u Europi pokazuje trend pada udjela prijavljenih MRSA izolata što nam govori da nacionalne smjernice i preporuke koje su pojedine zemlje donijele protiv širenja MRSA sojeva imaju učinka (18).

Istraživanje provedeno u Kanadi za razdoblje od 2007. do 2018. godine pokazuje da je od 283 MRSA izolata iz te zemlje, 67,1% bilo rezistentno na ciprofloksacin što je znatno manje u odnosu na ovo istraživanje, a 14,1% na mupirocin što se podudara s rezultatima ovog istraživanja (25).

Jednom nastali otporni mutanti lako se šire u zajednici, pogotovo ako genetski materijal koji kodira rezistenciju uđe u soj s velikim epidemijskim i virulentnim potencijalom. Dok su mjere kontaktne izolacije u bolničkoj sredini dobro definirane, mjere kontrole širenja rezistentnih sojeva u izvanbolničkoj sredini su manje jasne. Bolje definiranje epidemiološki bitnih sojeva te praćenje njihovih rezervoara i načina prijenosa pomoći će nam u ograničavanju širenja rezistencije i očuvanju djelotvornosti antibiotika (26).

Potrebne su veće inovacije i ulaganja u operativna istraživanja te u istraživanje i razvoj novih antimikrobnih lijekova, cjepiva i dijagnostičkih alata, osobito onih koji ciljaju na kritične gram-negativne bakterije, poput *Enterobacteriaceae* otpornih na karbapenem i *Acinetobacter baumannii* (17).

## **6. ZAKLJUČAK**



Rezultati testiranja osjetljivosti bakterija koje najčešće uzrokuju lokalizirane infekcije na topikalna antimikrobna sredstva, izoliranih tijekom 2020. godine u KBC Split, pokazali su sljedeće:

1. Izolati *Escherichia coli* koji ne luče ESBL te ESBL *Escherichia coli* su pokazali najveću stopu rezistencije na antibiotike ciprofloksacin i levofloksacin, a najmanju na kloramfenikol i kolistin. Pri usporedbi sojeva *Escherichia coli* koji ne luče ESBL s ESBL producirajućim sojevima, rezultati pokazuju znatno veću rezistenciju ESBL sojeva na sve ispitivane antibiotike osim na kolistin i kloramfenikol (testiran je mali broj sojeva).

2. Sojevi *Klebsiella pneumoniae* te ESBL *Klebsiella pneumoniae* su bili najrezistentnije na antibiotik tobramicin, a najmanje rezistentni na kloramfenikol i kolistin. ESBL sojevi su bili znatno rezistentniji na sve ispitivane antibiotike osim na kloramfenikol i kolistin (unatoč malom broju testiranih izolata) u odnosu na sojeve koji nisu lučili ESBL.

3. Sojevi *Pseudomonas aeruginosa* su bili najrezistentniji na kinolone, levofloksacin i ciprofloksacin. Zbog niske rezistencije na kolistin, ovaj antibiotik ostaje jedini lijek izbora za liječenje infekcija uzrokovanih ovom bakterijom.

4. Sojevi *Acinetobacter baumannii* su bili visoko rezistentni na sve ispitivane antibiotike (najrezistentniji na levofloksacin), dok je najmanji postotak rezistencije zabilježen za kolistin.

5. Izolati *Staphylococcus aureus* su bili najrezistentniji na levofloksacin, kao i MRSA sojevi koji su na ovaj antibiotik bili još rezistentniji od MSSA. MRSA sojevi su bili najosjetljiviji na mupirocin, a MSSA na kloramfenikol i norfloksacin. Mupirocin ostaje lijek izbora kod dekolonizacije *Staphylococcus aureus*.

## **7. LITERATURA**

1. Davey P, Wilcox M, Irving W, Thwaites G. Topical use of antimicrobial agents. Oxford University Press. 2015. doi:10.1093/med/9780199689774.003.0022.
2. Ray P, Singh S, Gupta S. Topical antimicrobial therapy: Current status and challenges. *Indian J Med Microbiol*. 2019;37:299-308.
3. von Stebut E. Significance of topical therapy in clinical situations. Location-dependent principles. *Hautarzt*. 2014 Mar;65(3):186-91. German. doi:10.1007/s00105-013-2657-3.
4. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, urednici. "Medicinska mikrobiologija (Jawetz, Melnick i Adelberg)". Dvadeset šesto američko izdanje/prvo hrvatsko izdanje. Split: Placebo d.o.o., 2015 (prijevod udžbenika). str. 199-250.
5. Dadashi M, Hajikhani B, Darban-Sarokhalil D, van Belkum A, Goudarzi M. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Mar;20:238-247. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.032. Epub 2019 Aug 20.
6. Madden GR, Sifri CD. Antimicrobial resistance to agents used for *Staphylococcus aureus* decolonization: Is there a reason for concern? *Curr Infect Dis Rep*. 2018 Jun 7;20(8):26. doi: 10.1007/s11908-018-0630-0.
7. Thomas C, Hothersall J, Willis C. i sur. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. *Nat Rev Microbiol* 8, 281–289 (2010). doi: 10.1038/nrmicro2278.
8. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. [obnovljeno 2021 Aug 11]. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2021 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
9. Taylor TA, Unakal CG. Staphylococcus Aureus. [obnovljeno 2021 Jul 21]. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing;2021 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
10. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M i sur. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Apr;17(4):203-218. doi:10.1038/s41579-018-0147-4.

11. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, DiIlio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Nov 25;10(12):6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235.
12. Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, Wachino JI, Kimura K, Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* and its rapid rise among healthy people. *Food Saf (Tokyo)*. 2017 Dec 29;5(4):122-150. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2017011.
13. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.
14. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Mar 13;7:55. doi:10.3389/fcimb.2017.00055.
15. European committee on antimicrobial susceptibility testing [Internet]. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance; 2021 Jan 6. Dostupno na: [https://eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://eucast.org/clinical_breakpoints/)
16. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis*. 2014 Jan 9;14:13. doi: 10.1186/1471-2334-14-13.
17. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030. Epub 2015 Sep 7.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020.
19. Center for Disease Control and Prevention [Internet]. How antibiotic resistance happens. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>
20. Galindo-Méndez M (July 17th 2020). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, E. Coli infections – Importance of early diagnosis and efficient treatment, Rodrigo L, Intech Open, doi: 10.5772/intechopen.93115. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/72615>

21. World Health Organization [Internet]. Antimicrobial resistance; 2020 Oct 13. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
22. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. Epub 2018 Nov 27.
23. Mohanty S, Baliyarsingh B, Nayak Kumar S (February 6th 2020). Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A concise review, *Antimicrobial resistance - A one health perspective*, Mihai M, Swee Hua EL, Kok-Song L, Romeo-Teodor C, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.88706. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/70980>
24. Brzozowski M, Krukowska Ż, Galant K. i sur. Genotypic characterisation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients of different hospitals and medical centres in Poland. *BMC InfectDis* 20, 693 (2020). doi: 10.1186/s12879-020-05404-w.
25. Zhane GG, Adam HJ, Baxter M, Lagace-Wiens PRS, Karlowsky JA, In vitro activity and resistance rates of topical antimicrobials fusidic acid, mupirocin and ozenoxacin against skin and soft tissue infection pathogens obtained across Canada (CANWARD 2007–18), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 76, Issue 7, July 2021, Pages 1808–1814
26. Tambić Andrašević A, Bukovac A, Jelić M, Šoprek S, Gužvinec M. *Escherichia coli* – od komenzala do multiplerezistentnog uropatogena. *Infektološki glasnik* [Internet]. 2014 [pristupljeno 15.10.2021.];34(4):189-194. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/143362>

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovoga rada je utvrditi osjetljivost bakterija koje najčešće izazivaju lokalizirane infekcije u KBC Split tijekom 2020. godine na pojedine topikalne antimikrobne lijekove kako bi se ustanovilo koji od testiranih antibiotika je najbolji izbor za empirijsko liječenje ovih infekcija.

**Materijal i metode:** Retrospektivnim istraživanjem analizirani su podaci o osjetljivosti na topikalne antimikrobne lijekove (aminoglikozide, fluorokinolone, kloramfenikol, kolistin te mupirocin) pojedinih vrsta bakterija koje su najčešći uzročnici lokaliziranih infekcija: *Escherichia coli* i ESBL *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (uključujući i ESBL sojeve), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* te *Staphylococcus aureus* (uključujući MRSA). Osjetljivost je ispitivana metodom disk difuzije, a za kolistin metodom dilucije u bujonu.

**Rezultati:** Rezultati pokazuju visoku rezistenciju bakterije *Escherichia coli* na antibiotike ciprofloksacin i levofloksacin, a najmanju na kloramfenikol i kolistin. U usporedbi s *Escherichia coli*, ESBL producirajući soj *Escherichia coli* pokazuje znatno veću rezistenciju na sve ispitivane antibiotike osim na kolistin i kloramfenikol. Sojevi *Klebsiella pneumoniae* su bili najrezistentniji na antibiotik tobramicin, a najmanje rezistentni na kloramfenikol i kolistin. ESBL producirajući sojevi ove bakterije su bili znatno rezistentniji na sve ispitivane antibiotike osim na kloramfenikol i kolistin. *Pseudomonas aeruginosa* je bio najrezistentniji na ciprofloksacin i levofloksacin, a najmanje na kolistin. Sojevi *Acinetobacter baumannii* su bili najrezistentniji na levofloksacin, a najmanje na kolistin. Izolati *Staphylococcus aureus* su bili najrezistentniji na levofloksacin, a najosjetljiviji na kloramfenikol i norfloksacin. MRSA sojevi su bili najviše rezistentni na levofloksacin, u značajno većim postocima od MSSA sojeva, a najveću osjetljivost pokazali su na mupirocin.

**Zaključak:** Podaci ove studije pokazuju visoke stope rezistencije ispitivanih bakterija na pojedine topikalne antimikrobne lijekove što je u skladu s trendovima porasta rezistencije bakterija u svijetu te možemo pretpostaviti da će se ta rezistencija u budućnosti još povećavati. Stoga su potrebni dodatni napor i restrikcije koje će omogućiti primjereniju uporabu antibiotika kako bi se spriječilo širenje rezistentnih sojeva.

## **9. SUMMARY**



**Diploma Thesis Title:** *In vitro* efficacy of topical antimicrobial drugs

**Objective:** The main aim of this research was to determine the susceptibility of bacterial isolates which are that most frequent causative agents of localized infections in UHC Split in 2020 to certain topical antimicrobial drugs and to determine which of the antibiotics tested is the best choice for empirical treatment of these infections.

**Material and methods:** In this retrospective study the data of susceptibility to topical antimicrobial drugs (aminoglycosides, fluoroquinolones, chloramphenicol, colistin and mupirocin) of certain types of bacteria that are the most common causes of localized infections were analyzed. Bacterial isolates included were *Escherichia coli* and ESBL *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (including *Klebsiella pneumoniae* ESBL strains), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Staphylococcus aureus* (including MRSA). Sensitivity was examined by disk diffusion method, and for colistin by broth dilution method.

**Results:** The results showed high resistance rates of *Escherichia coli* to the antibiotics ciprofloxacin and levofloxacin, and the lowest rates to chloramphenicol and colistin. Compared with *Escherichia coli*, the ESBL-producing strain of *Escherichia coli* showed significantly higher resistance to all tested antibiotics except colistin and chloramphenicol. Strains of *Klebsiella pneumoniae* were the most resistant to the antibiotic tobramycin, and the least resistant to chloramphenicol and colistin. ESBL-producing strains of this bacterium were significantly more resistant to all tested antibiotics except chloramphenicol and colistin. *Pseudomonas aeruginosa* was most resistant to ciprofloxacin and levofloxacin, and least to colistin. *Acinetobacter baumannii* strains were the most resistant to levofloxacin and the least to colistin. *Staphylococcus aureus* isolates were the most resistant to levofloxacin and the most sensitive to chloramphenicol and norfloxacin. MRSA strains were most resistant to levofloxacin in significantly higher percentages than MSSA strains, and showed the highest sensitivity to mupirocin.

**Conclusion:** The data from this study follow the global trends of increasing resistance, and can be assumed that this number will increase in the future. Restrictions are needed to allow more appropriate use of antibiotics to prevent the spread of resistant strains.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **Osobni podatci**

Ime i prezime: Kristina Zurak

Adresa: Ive Mašine 3, 23 000 Zadar

Telefon: : 00 385 9963770 01

Elektronska pošta: kristina.zurak4@gmail.com

Državljanstvo: Hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 26. prosinca 1996. godine, Zadar

## **Obrazovanje**

2003.- 2011. Osnovna škola Smiljevac, Zadar

2011.- 2015. Gimnazija Franje Petrića, Zadar

2015.-2016. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

2016.-2021. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, smjer Farmacija

## **Strani jezici**

Engleski jezik: aktivno znanje

Talijanski jezik: pasivno znanje