

# Antimikrobna osjetljivost karbapenem-rezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* iz uzoraka donjih dišnih puteva u Kliničkom bolničkom centru Split u 2022. godini

---

**Mytko, Natalia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:027244>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Natalia Mytko**

**ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST KARBAPENEM-REZISTENTNIH IZOLATA  
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IZ UZORAKA DONJIH DIŠNIH PUTEVA U  
KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT U 2022. GODINI**

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**doc. prim. dr. sc. Anita Novak**

**Split, srpanj 2023.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Natalia Mytko**

**ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST KARBAPENEM-REZISTENTNIH IZOLATA  
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IZ UZORAKA DONJIH DIŠNIH PUTEVA U  
KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU SPLIT U 2022. GODINI**

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2022./2023.**

**Mentor:**

**doc. prim. dr. sc. Anita Novak**

**Split, srpanj 2023.**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Građa stanice <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	2
1.2. Čimbenici virulencije <i>K. pneumoniae</i> .....	3
1.2.1. Polisaharidna kapsula .....	4
1.2.2. Lipopolisaharidi .....	4
1.2.3. Siderofore.....	5
1.2.4. Fimbrije .....	5
1.2.5. Biofilm .....	5
1.3. Epidemiologija i infekcije koje uzrokuje <i>K. pneumoniae</i> .....	6
1.4. Dijagnostika upale pluća koju uzrokuje <i>K. pneumoniae</i> .....	7
1.5. Liječenje infekcija.....	8
1.5.1. Aminoglikozidi .....	8
1.5.2. Fluorokinoloni .....	8
1.5.3. Beta-laktamski antibiotici .....	9
1.5.4. Novi antibiotici te kombinacije antibiotika i inhibitora lučenja β-laktamaza	11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	15
2.1. Cilj istraživanja.....	16
2.2. Hipoteze .....	16
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Izolati .....	18
3.2. Mjesto istraživanja .....	18
3.3. Ustroj istraživanja .....	18
3.4. Opis istraživanja .....	18
3.5. Statistička obrada podataka .....	18
4. REZULTATI .....	18
4.1. Izolati .....	20

4.2. Demografski podatci.....	20
4.3. Raspodjela pacijenata na bolničku i izvanbolničku populaciju .....	22
4.4. Raspodjela pacijenata prema uputnim dijagnozama.....	22
4.5. Raspodjela uzoraka donjih dišnih puteva iz kojih je izolirana karbapenem- rezistentna <i>K. pneumoniae</i> .....	23
4.6. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike <i>K. pneumoniae</i> OXA-48 .....	24
4.7. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike <i>K. pneumoniae</i> KPC .....	25
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI .....	31
7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....	33
8. SAŽETAK .....	38
9. SUMMARY .....	40
10. ŽIVOTOPIS.....	412

## **POPIS KRATICA**

AME – engl. *Aminoglycoside modifying enzymes*

C/A – *ceftazidim/avibaktam*

COVID-19 – engl. *Coronavirus disease 2019*

DDST – engl. *Double-Disk Synergy Test*

DNK – *Deoksiribonukleinska kiselina*

DZ – *Dom zdravlja*

EMA – engl. *European Medicine Agency*

ESBL – engl. *Extended Spectrum Beta-Lactamase*

FDA – engl. *Food and Drug Administration*

GIT – *Gastrointestinalni trakt*

HAP – engl. *Hospital associated pneumonia*

ICU – engl. *Intensive care unit*

KA – *Krvni agar*

KBC – *Kliničko bolnički centar*

KPC – *Klebsiella pneumoniae karbapenemaza*

KRE – *Enterobakterije odporne na karbapeneme*

LPS – *Lipopolisaharidi*

MALDI – TOF MS – engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

MBL – *Metallo-Beta-Laktamaza*

MDR – engl. *Multidrug resistant*

MIK – *Minimalne inhibitorne koncentracije*

ORL – *Otorinolaringologija*

OXA-48 – *Oksacilinaza-48*

PBP – engl. *Penicillin-binding protein*

RNK – *Ribonukleinska kiselina*

SHV – *Sulfhidril varijanta*

VAP – engl. *Ventilator associated pneumonia*

WHO – engl. *World health organization*

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici na uloženom vremenu, stručnoj pomoći i velikom strpljenju pri pisanju ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji, majci Eleni, očuhu Dušanu i sestri Polini na podršci i beskrajnom strpljenju tijekom ovog studija. Posebna zahvala mojoj baki Ljudmili koja je bila velika inspiracija u području medicine.*

*Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegama koji su mi učinili ovaj studij ljepšim, zanimljivijim te su uvijek bili spremni pomoći.*



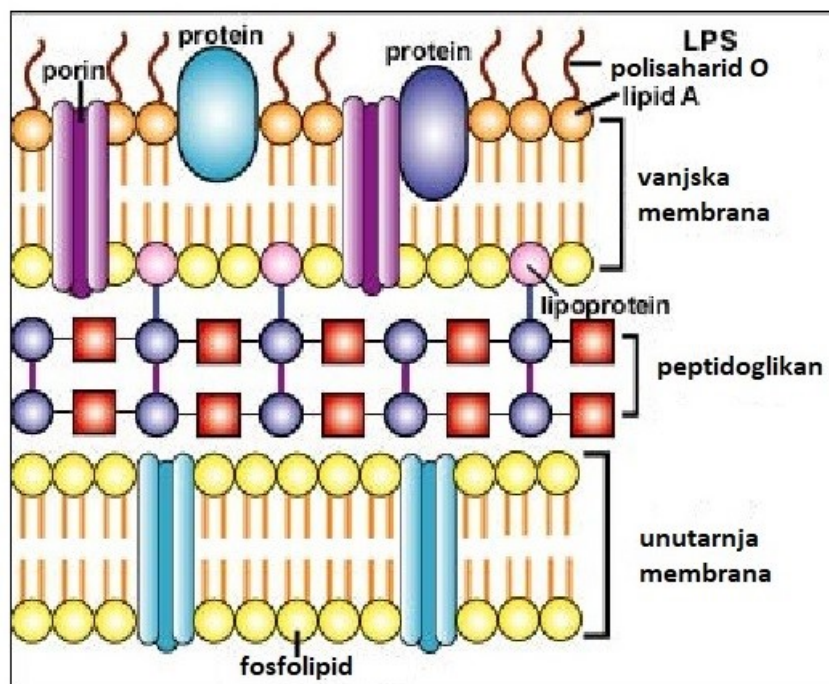
## **1. UVOD**

*Klebsiella pneumoniae* je gram-negativna, inkapsulirana, laktoza-fermentirajuća, nepokretna bakterija koja pripada obitelji *Enterobacteriaceae* (1). To je velika, heterogena skupina gram-negativnih štapića čije je prirodno stanište gastrointestinalni sustav čovjeka i životinja (2). *K. pneumoniae* je prosječne duljine oko 1  $\mu\text{m}$  i širine oko 0,5 do 0,8  $\mu\text{m}$  te se obično nalazi pojedinačno ili u parovima. Fakultativni je anaerob, koji se lako kultivira na različitim umjetnim hranilištima na kojima stvara sluzave kolonije (2, 3).

### 1.1. Građa stanice *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* sadrži brojne unutarstanične i izvanstanične komponente. Jedan od najznačajnijih dijelova bakterijske stanice je stanična stijenka, koja bakteriji daje čvrstoću te služi kao osnova za vlastitu biosintezu i diobu stanice (2).

Kao i kod ostalih gram-negativnih bakterija, stanična stijenka *K. pneumoniae* sastoji se od sloja peptidoglikana, lipoproteina te vanjske membrane u koju su ugrađeni lipopolisaharidi (LPS), kao što se vidi na slici 1.



Slika 1. Građa stanične stijenke gram-negativnih bakterija. **Izvor:** 2.3B: The Gram-Negative Cell Wall [Internet]. Biology LibreTexts. 2016 [cited 2023 Jun 29]. Dostupno na: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\\_%28Kaiser%29/Unit\\_1%3A\\_An\\_Introduction\\_to\\_Microbiology\\_and\\_Prokaryotic\\_Cell\\_Anatomy/2%3A\\_The\\_Prokaryotic](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_%28Kaiser%29/Unit_1%3A_An_Introduction_to_Microbiology_and_Prokaryotic_Cell_Anatomy/2%3A_The_Prokaryotic)

## Cell - Bacteria/2.3%3A The Peptidoglycan Cell Wall/2.3B%3A The Gram-Negative Cell Wall

Za razliku od gram-pozitivnih bakterija koje imaju 40 slojeva peptidoglikana (što čini gotovo 50% materijala stanične stijenke), gram-negativne bakterije imaju svega par slojeva peptidoglikana, koji čine 5-10% stanične stijenke (2).

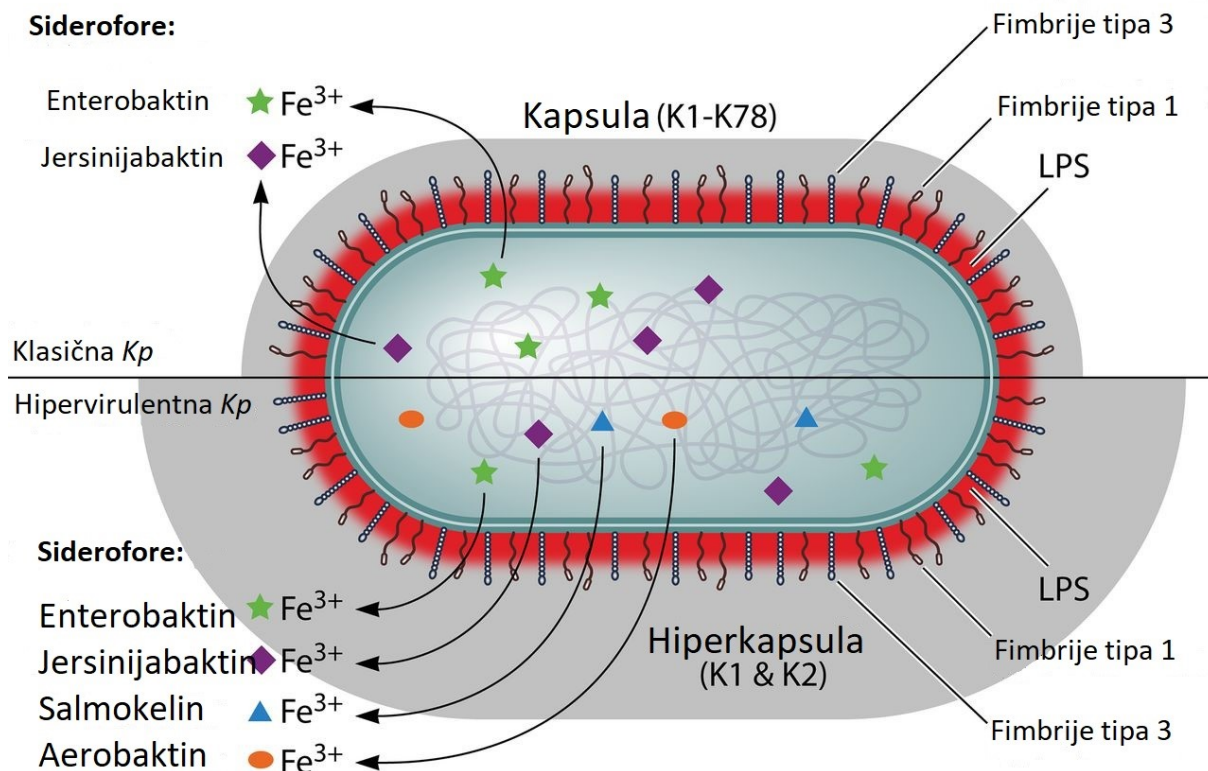
Vanjska membrana bakterije je građena kao asimetričan dvosloj; unutarnji sloj nalikuje staničnoj membrani, a vanjski sloj ima sposobnost odbijanja hidrofobnih molekula, što služi kao zaštita od štetnih spojeva, primjerice žučnih kiselina. U vanjsku su membranu uronjeni posebni kanali – porini koji služe za pasivnu difuziju hidrofilnih sastojaka. Velike molekule, poput antibiotika, vrlo sporo prolaze kroz vanjsku membranu, što doprinosi antibiotskoj rezistenciji gram-negativnih bakterija (2).

Lipopolisaharid (LPS) u stijenki gram-negativnih bakterija sastoji se od složenog glikolipida (lipid A) na koji je pričvršćen polisaharid. Lipid A je uklopljen u vanjski sloj membrane. Polisaharidni dio se sastoji od središnjeg dijela i jedinstvene ponavljajuće jedinice (O antigena). LPS koji se otpušta prilikom razgradnje stanice iznimno je toksičan jer se raspada na polisaharidni dio i na lipid A, koji se još naziva endotoksin (2).

Negativno nabijene molekule LPS-a su nekovalentno križno povezane dvovalentnim kationima, što omogućava stabilizaciju membrane. Njihovo odstranjenje kelirajućim agensima ili zamjena polikationskim antibioticima, kao što su polimiksini ili aminoglikozidi, destabilizira membranu i čini je propusnom za hidrofobne molekule (2).

### **1.2. Čimbenici virulencije *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* može posjedovati brojne faktore virulencije, prema kojima se klasificira u klasične i hipervirulentne sojeve (slika 2).



Slika 2. Prikaz čimbenika patogenosti *K. pneumoniae*. **Izvor:** Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80:629-61.

### 1.2.1. Polisaharidna kapsula

Polisaharidna kapsula je najvažniji čimbenik virulencije kojim bakterije izbjegavaju opsonizaciju i fagocitozu od strane domaćina, kao i aktivaciju komplementa te ostale kaskadne reakcije domaćina tijekom imunološkog odgovora (1, 3, 4). Do danas je poznato 77 antigenskih tipova kapsule, a sojevi bez kapsule su obično slabije virulentni (1). Većinu klinički značajnih infekcija uzrokuje relativno mali broj kapsularnih serotipova (5). Tako npr., pneumoniju najčešće uzrokuju serotipovi od 1 do 6. Termostabilni antigeni K mogu se identificirati metodom bubrenja kapsule (3).

### 1.2.2. Lipopolisaharidi

Značajan faktor virulencije su lipopolisaharidi koji se sastoje od polisaharida i lipida A. Somatski ili O antigen čini središnji dio polisaharida, značajan je imunogen ljudi i životinja, a njegova je antigena specifičnost nastala zbog izrazite varijabilnosti među vrstama i unutar sojeva iste vrste. *K. pneumoniae* ima devet O-antigenskih tipova, pri čemu je O1 najčešća serogrupa povezana s infekcijama ljudi. Lipid A djeluje kao toksin pa intravaskularno

oslobađanje lipopolisaharida pokreće upalnu kaskadnu reakciju domaćina i nastanak simptoma sepse i septičkog šoka (1, 2, 5).

### 1.2.3. Siderofore

Esencijalno željezo je neophodan kofaktor u bakterijskom metabolizmu, a jedan od najučinkovitijih načina za njegovo hvatanje je proizvodnja kelatora željeza, tkz. siderofora. *K. pneumoniae* ima četiri sustava za unos željeza posredovana sideroforama: enterobaktini, jersinijabaktini, salmokelini i aerobaktini. Enterobaktin ima najveći afinitet prema željezu i široko je rasprostranjen među sojevima *K. pneumoniae*. S druge strane, aerobaktin i salmokelin karakteristični su za hipervirulentne sojeve *K. pneumoniae* (4). Naime, dokazano je da invazivniji sojevi imaju veću potrebu za željezom pa je u njih jača ekspresija gena koji kodiraju siderofore (5).

### 1.2.4. Fimbrije

Fimbrije omogućuju bakterijama vezanje za stanice domaćina (1). *K. pneumoniae* ima dvije glavne klase fimbrija, tip I i tip III. Imaju funkciju adhezina, potičući vezanje na biološke površine (s naknadnom invazijom tkiva), ali i na abiotičke površine (npr. medicinske uređaje), gdje bakterije stvaraju biofilm.

Fimbrije tipa I se vežu za receptore koji sadrže manozu (nalaze se u različitim tkivima ljudskog organizma), ali su značajne i za međusobno povezivanje bakterija.

Fimbrije tipa III se vežu na različite tipove stanica, uključujući epitelne stanice pluća, bubrega i mokraćnog mjehura, ali im je glavna uloga stvaranje biofilma (4, 5).

### 1.2.5. Biofilm

Biofilm je dobro strukturirana mikrobna zajednica koja osigurava bakteriji povećanu otpornost na antimikrobne čimbenike i obranu domaćina (npr. sustav komplementa, antimikrobne peptide i fagocitozu). Ima vrlo složenu i heterogenu strukturu, a sastoji se od bakterija obavijenih izvanstaničnim matriksom koji sadržava proteine, ugljikohidrate i genetski materijal, koji potječe od bakterija i stanica domaćina. Doprinosi kolonizaciji i patogenezi bakterijske infekcije (5).

*K. pneumoniae* stvara biofilm na abiotičkim površinama kao što su medicinski uređaji i kateteri, kao i na tkivima domaćina poput sluznice respiratornog, urinarnog i gastrointestinalnog trakta. Nekoliko čimbenika pridonosi stvaranju biofilma *K. pneumoniae*.

To uključuje, između ostalog, polisaharidnu kapsulu, fimbrije i pile, proizvodnju siderofora, ali i prisutnost različitih drugih bakterijskih vrsta (4, 6).

Formiranje biofilma složen je proces koji je podijeljen u nekoliko faza koje uključuju pričvršćivanje, proizvodnju mikrokolonija, formiranje zrelog biofilma i oslobađanje slobodnoživućih planktonskih bakterija iz biofilma. Osnovu biofilma čini gusta mreža proteina, polisaharida i DNK koja sprječava učinkovitu difuziju antibiotika na mjesto infekcije ili povećava razgradnju antibiotika unutar biofilma. Bakterije koje se nalaze duboko unutar biofilma, rastu puno sporije od planktonskih bakterija ili onih blizu površine biofilma. Zbog toga su bakterije smještene u dubini biofilma manje osjetljive na djelovanje antibiotika koji ometaju fazu aktivnog rasta i dijeljenja bakterija. Osim toga, kod ovih spororastućih bakterija su slabije izraženi specifični proteinski receptori koji vežu antimikrobne tvari. Promjene u ekspresiji gena bakterija koje rastu unutar biofilma, u usporedbi sa slobodnoživućim organizmima, također mogu dovesti do antimikrobne otpornosti. Naime, prijenos genetskog materijala između bakterijskih stanica je brži unutar biofilma pa se tako mogu brže prenijeti i geni rezistencije na antibiotike. Zbog svih ovih faktora, nastanak biofilma je značajan čimbenik bakterijske patogenosti i otpornosti te doprinosi nastanku kroničnih infekcija (5).

### **1.3. Epidemiologija i infekcije koje uzrokuje *K. pneumoniae***

Primarni rezervoar *K. pneumoniae* je čovjek pa je i najznačajniji izvor infekcije gastrointestinalni sustav čovjeka. Stopa kliconoštva u vanbolničkoj populaciji je 5 do 38% u crijevima te 1 do 6% u nazofarinksu. U hospitaliziranih pacijenata, stopa kliconoštva je mnogo veća od one u izvanbolničkoj populaciji te iznosi čak 77%.

*K. pneumoniae* je oportunistički patogen koji može uzrokovati različite infekcije, uključujući upalu pluća, infekcije urinarnog trakta, bakterijemiju, meningitis, endoftalmitis, apscese jetre i infekcije mekih tkiva, osobito u imunokompromitiranih pacijenata (npr. dijabetičara, alkoholičara i onkoloških bolesnika) (7, 8).

Najčešće su kolonizirani pacijenti u jedinicama intenzivne njege, intubirani, traheotomirani i pacijenti na mehaničkoj ventilaciji. Među rizične pacijente spadaju i oni s poremećajem svijesti kao i pacijenti koji primaju veći broj antibiotika (1, 3).

Najznačajniji put prijenosa su kontaminirane ruke zdravstvenih djelatnika. Suzbijanje širenja infekcije *K. pneumoniae* obuhvaća provođenje striktnih mjera za sprječavanje bolničkih infekcija, ponajviše temeljita higijena i pranje ruku, dezinfekcija bolničkih površina i racionalno propisivanje i primjena antibiotika (3).

#### 1.4. Dijagnostika upale pluća koju uzrokuje *K. pneumoniae*

Klinička slika upale pluća koju uzrokuje *K. pneumoniae* ne može se sa sigurnošću razlikovati od upale pluća druge etiologije. Najznačajniji klinički simptomi su kašalj, vrućica, bol u prsima i otežano disanje. Ispljuvak može nalikovati na "žele od ribizla" jer *K. pneumoniae* uzrokuje jaku upalu i nekrozu okolnog tkiva. Često stvara apscese (25% slučajeva) i empijeme (35% pneumonija) (1, 3).

Infekcija obično zahvaća gornje režnjeve, iako može zahvatiti i donje dijelove pluća. Auskultacijski nalaz obično odgovara lobarnoj pneumoniji te se čuju bronhalno disanje i krepitacije. Rendgenski nalaz najčešće otkriva opsežnu lobarnu ili segmentalnu infiltraciju stražnjeg dijela gornjeg desnog režnja s karakterističnim interlobarnim izljevom, ali može prikazati i bronhopneumonična žarišta, kao i zahvaćanje više režnjeva (1, 3). Laboratorijska analiza krvi obično pokazuje leukocitozu, međutim, to je nedovoljno za postavljanje pouzdane etiološke dijagnoze (1, 3).

Kod sumnje na upalu pluća, potrebno je uzeti uzorak iz donjih dijelova dišnog sustava za mikrobiološku dijagnostiku. Najbolje je uzeti aspirat bronha ili inducirani iskašljaj za direktnu dijagnostiku: mikroskopiju i kultivaciju uzročnika. Uzorci iz donjeg dišnog sustava se kultiviraju na bakteriološkim hranilištima (kao što je krvni agar, KA). Identifikacija se provodi ispitivanjem biokemijskih svojstava (tkz. biokemijskom serijom) gdje se ispituje sposobnost bakterije da razgradi različite supstrate (šećere, alkohole i aminokiseline) ili novijim metodama kao što je MALDI-TOF MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). MALDI-TOF MS je metoda masene spektrometrije koja se temelji na laserskoj razgradnji i ionizaciji bakterijskih proteina, koji ovisno o svojoj veličini i naboju, putuju različitom brzinom i stvaraju karakteristični matematički zapis dobivenih signala, koji su specifični za različite bakterijske vrste. Osim klasičnih kultivacijskih metoda, mogu se koristiti i molekularne metode dokazivanja bakterijske DNK, kao što je lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR). Nakon identifikacije bakterijske vrste, slijedi ispitivanje osjetljivosti izoliranog soja na antibiotike klasičnom metodom disk difuzije po Kirby-Bauer ili određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija antibiotika (MIK) gradijent strip testom. Stvaranje  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra ispituje se fenotipski tkz. probirnim testom sinergizma između beta-laktamskih antibiotika sa i bez dodatka inhibitora  $\beta$ -laktamaza (engl. *Double-disk synergy test*, DDST) ili molekularnim metodama. Proizvodnja karbapenemaza se detektira imunokromatografskim testovima ili molekularnim metodama.

Pored uzoraka iz donjih dišnih puteva, obavezno se uzima uzorak krvi za hemokulturu, jer je pneumonija najčešće praćena bakterijemijom (2).

### **1.5. Liječenje infekcija**

U liječenju upale pluća uzrovanе *K. pneumoniae* mogu se koristiti antibiotici koji pripadaju različitim klasama i imaju različite mehanizme djelovanja. U odabiru antibiotika za empirijsko liječenje potrebno je slijediti nacionalne postupnike i poznavati lokalnu stopu rezistencije na određene klase antibiotika. Nakon izrade antibiograma, primjenjuje se ciljana terapija prema rezultatima testiranja.

*K. pneumoniae* ima urođenu rezistenciju na ampicilin, a može razviti stečenu rezistenciju na različite klase antibiotika, što značajno otežava liječenje ovih infekcija.

#### **1.5.1. Aminoglikozidi**

Aminoglikozidi su inhibitori sinteze bakterijskih proteina, a svoje djelovanje ostvaruju vezanjem na 30S podjedinicu ribosoma. Za ulazak u bakterijsku stanicu koriste porinske kanale vanjske membrane, te se zatim procesom ovisnim o kisiku prenose kroz staničnu membranu u citoplazmu. Prijenos je bolji što je stanična stijenka tanja, kao što je to u gram-negativnih bakterija (9).

Utvrđeno je nekoliko mehanizama rezistencije na aminoglikozide: stvaranje transferaza (inaktivacija aminoglikozida adenilacijom, acetilacijom ili fosforilacijom), otežan ulazak u stanicu (genotipski, zbog mutacije porinskih kanala ili fenotipski, npr. u uvjetima rasta u kojima prijenos o kisiku nije djelotvoran) te promjena ciljnog mjesta (mutacija receptorskog proteina na 30S podjedinici ribosoma) (9).

Rezistencija *K. pneumoniae* je najčešće posljedica stvaranja transferaza, odnosno tzv. AME – enzima koji modificiraju aminoglikozide (engl. *Aminoglycoside modifying enzymes*, AME). Može posjedovati plazmide koji prenose sve vrste gena koji kodiraju aminoglikozidnu rezistenciju (geni *aac*, *aph* i *ant*) kao i gen za sintezu metilaze 16S rRNK, enzima koji blokira vezanje aminoglikozida na 16S rRNK i kodira otpornost na gotovo sve poznate aminoglikozide (6).

#### **1.5.2. Fluorokinoloni**

Fluorokinoloni su sintetski fluorirani analozi nalidiksične kiseline. Mehanizam njihovog djelovanja temelji se na blokiranju bakterijske sinteze DNK, inhibirajući bakterijsku topoisomerazu II (DNK-girazu) i topoisomerazu IV. Inhibicija DNK-giraze sprječava



relaksaciju pozitivno zavijene DNK koja je potrebna za normalnu transkripciju i translaciju. Inhibicija topoizomeraze IV interferira sa odvajanjem replicirane kromosomske DNK u stanice kćeri tijekom dijeljenja stanice (9).

Rezistencija na fluorokinolone najčešće nastaje zbog mutacije regije koja kodira mjesto vezanja fluorokinolona na DNK-girazu (QRDRs) ili zbog plazmidom posredovane determinante koja štiti DNK girazu i topoizomerazu IV od djelovanja kinolona. Također, može biti posljedica promjene propusnosti bakterijske membrane. Rezistencija na jedan fluorokinolon, osobito ako je visoka, često uzrokuje križnu rezistenciju i na sve druge pripadnike skupine (9, 10).

Ciprofloksacin učinkovito djeluje na gram-negativne bakterije, posebno *Enterobacteriaceae*. U usporedbi s ciprofloksacinom, levofloksacin ima bolju aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama. Levofloksacin, kao i moksifloksacin, koriste se u liječenju infekcija višestruko-otpornim bakterijama (engl. *multidrug-resistant*; MDR). Iako nove generacije fluorokinolona imaju bolju antimikrobnu učinkovitost, mnogi od njih su napušteni iz kliničke prakse zbog nepovoljnog sigurnosnog profila pa stariji fluorokinoloni ostaju jedine dostupne alternative (10, 11).

### **1.5.3. Beta-laktamski antibiotici**

U skupinu beta-laktamskih antibiotika spadaju penicilini, cefalosporini, monobaktami i karbapenemi.

Mehanizam djelovanja svih beta-laktamskih antibiotika temelji se na inhibiciji rasta bakterije ometajući reakciju transpeptidacije u tijeku sinteze stanične stijenke. U tom procesu sudjeluje protein koji veže peniciline PBP (engl. *penicillin-binding protein*), kao membranski protein koji omogućava umrežavanje peptidoglikana. Stoga su beta-laktamski antibiotici djelotvorni samo u fazi aktivnog rasta i sinteze stanične stijenke.

Opisano je nekoliko mehanizama rezistencije na beta-laktame: inaktivacija antibiotika beta-laktamazama, modifikacija ciljnog PBP-a, smanjen prodor lijeka do ciljnog PBP-a te izbacivanje lijeka iz stanice (efluksne pumpe) (9).

Otkriće penicilina jedno je od najvećih javnozdravstvenih dostignuća 20. stoljeća. Međutim, otpornost na beta-laktamske antibiotike pojavila se prije nego što se penicilin počeo koristiti za liječenje infekcija. Naime, još je Alexander Fleming primijetio da *Escherichia coli* i druge gram-negativne bakterije nisu bile inhibirane penicilinom (12).

Iako je klasični penicilin pokazivao antibakterijsko djelovanje na gram-negativne bakterije *in vitro*, primjena penicilina u liječenju infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama ušla je u praksu tek razvojem aminopenicilina (13).

Penicilini proširena spektra (aminopenicilini, karboksipenicilini i ureidopenicilini) pokazuju veću djelotvornost prema gram-negativnim bakterijama od drugih penicilina zbog svoje povećane sposobnosti prodiranja kroz njihovu vanjsku membranu (iako ih inaktivira veliki broj  $\beta$ -laktamaza) (9).

Šezdesetih godina prošlog stoljeća otkrivena je prva plazmidom posredovana  $\beta$ -laktamaza, TEM-1, kod *E. coli* (12).

Sljedeći korak u evoluciji rezistencije gram-negativnih patogena bila je pojava  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum beta-lactamases*; ESBL). Iako je teško definirati ovu skupinu  $\beta$ -laktamaza, najčešće primjenjivana definicija odnosi se na  $\beta$ -laktamaze koje su sposobne hidrolizirati peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te aztreonam (ali ne i cefamicine ili karbapeneme), dok inhibitori beta-laktamaza, kao što je klavulanska kiselina, inhibiraju njihov učinak (14). Prvi zabilježeni ESBL enzimi bili su mutirane varijante plazmidnih beta-laktamaza TEM-1 i SHV-1 (13).

Zbog rasta prevalencije gram-negativnih bakterija koji proizvode beta-laktamaze proširenog spektra, antibiotici izbora u liječenju teških infekcija postaju karbapenemi (npr. imipenem, meropenem, ertapenem). To su beta-laktamski antibiotici koji kombiniraju iznimnu antibakterijsku aktivnost i stabilnost zbog otpornosti na hidrolizu većine poznatih beta-laktamaza, uključujući ESBL i AmpC (15).

Najznačajniji mehanizmi rezistencije *Enterobacteriaceae* na karbapeneme su: proizvodnja enzima, efluksne pumpe i mutacije porina. Postoje tri glavne skupine enzima koji su odgovorni za većinu rezistencije na karbapenem: KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza; Amblerova klasa A), MBL (Metalo- $\beta$ -laktamaze; Amblerova klasa B) i OXA-48 (Oksacilinaza-48; Amblerova klasa D) (16). Ova rezistencija se prenosi pomoću plazmida, što implicira lakši horizontalni prijenos, a time i njeno brže širenje.

Imajući na umu brojne mehanizme pomoću kojih *Enterobacteriaceae* mogu steći rezistenciju na karbapeneme, postoje različiti pristupi liječenju infekcija uzrokovanih ovim bakterijama, koji uključuju prenamjenu već postojećih antibiotika, kombiniranu terapiju s dva

do tri antibiotika različitih klasa i mehanizama djelovanja, a dostupne su i nove kombinacije inhibitora  $\beta$ -laktamaza i antibiotika (16).

#### **1.5.4. Novi antibiotici te kombinacije antibiotika i inhibitora lučenja $\beta$ -laktamaza**

##### **1.5.4.1. Cefiderokol**

Cefiderokol je novi sideroforni cefalosporin koji djeluje na gram-negativne bakterije, a može se dati i za liječenje infekcija uzrokovanih sojevima otpornim na karbapeneme (17).

Cefiderokol je odobren od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) u listopadu 2019. za liječenje infekcija mokraćnog sustava, a u rujnu 2020. za liječenje bolničke upale pluća i bakterijske upale pluća povezane sa strojnom ventilacijom (engl. *Ventilator-associated pneumonia*, VAP) (18).

Po strukturi je sličan ceftazidimu i cefepimu, zbog čega je otporan na hidrolizu  $\beta$ -laktamazama. Može vezati izvanstanično slobodno željezo putem svojega siderofornog postraničnog lanca, čime omogućava aktivni prijenos u periplazmatski prostor gram-negativne bakterije putem sustava unosa siderofora (17). U periplazmatskom prostoru, cefiderokol se veže na PBP, posebno PBP3, inhibirajući sintezu peptidoglikana u bakterijskoj staničnoj stijenci. Većina klinički značajnih karbapenemaza, uključujući KPC, OXA-48 i New Delhi MBL, ne djeluju na cefiderokol (17, 19).

Rezistencija na cefiderokol obično proizlazi iz koekspresije višestrukih  $\beta$ -laktamaza i/ili prekomjerne ekspresije  $\beta$ -laktamaza, moguće u kombinaciji s promjenama u PBP3 i mutacijama povezanim sa smanjenom propusnošću, kao što su one koje utječu na ekspresiju/funkciju receptora siderofora i, u manjoj mjeri, porina i/ili efluksne pumpe (19).

##### **1.5.4.2. Ceftazidim/avibaktam**

Ceftazidim/avibaktam (C/A) je kombinacija cefalosporina treće generacije i inhibitora beta-laktamaza. Ceftazidim djeluje baktericidno tako što se veže za PBP te inhibira sintezu bakterijske stijenske.

Avibaktam je inhibitor beta-laktamaza i sam po sebi nema antibiotsko djelovanje, ali djeluje sinergistički s ceftazidimom. Uglavnom inhibira beta-laktamaze klase A i klase C te u manjoj mjeri klasu D, dok na beta-laktamaze klase B (metalo-beta-laktamaze) ne djeluje (20).

Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) i FDA su ga odobrile 2015. godine za liječenje kompliciranih intraabdominalnih infekcija, kompliciranih infekcija mokraćnog sustava, bolničke upale pluća te VAP-a, koji su uzrokovani višestruko-

otpornim bakterijama. Stoga se često koristi kao lijek izbora za infekcije koje uzrokuju bakterije rezistentne na karbapeneme (21).

Otpornost na ceftazidim/avibaktam je obično posljedica prisutnosti metalo- $\beta$ -laktamaza budući da ih avibaktam ne inhibira. Ostali mehanizmi rezistencije uključuju povećanu ekspresiju ili specifične mutacije u genima koji kodiraju karbapenemaze, promjene u staničnoj propusnosti (tj. gubitak porina) te prekomjernu ekspresiju efluksnih pumpi (22).

#### **1.5.4.3. Meropenem/vaborbaktam**

Vaborbaktam je novi inhibitor beta-laktamaza koji djeluje na bakterije koje proizvode KPC. Sam vaborbaktam nema antibakterijsko djelovanje, međutim, u kombinaciji s meropenemom djeluje protiv gram-negativnih organizama, posebno protiv sojeva *K. pneumoniae* koji proizvode beta-laktamaze klase A i C, a imaju smanjenu propusnost stanične membrane zbog mutacije porina (23, 24). Međutim, kombinacija meropenem-vaborbaktam ne djeluje protiv OXA-48 ili metalo-beta laktamaza (24).

Meropenem, je otporan na hidrolizu većine beta-laktamaza koje proizvode gram-negativne i gram-pozitivne bakterije, uključujući penicilinaze i cefalosporinaze. Ispoljava svoje baktericidno djelovanje tako što se veže za PBP u bakterijskoj staničnoj stijenci i inhibira umrežavanje peptidoglikana, što dovodi do stanične smrti (25). Vaborbaktam sadrži prsten bora, zbog čega je superiorniji u usporedbi sa starijim inhibitorima beta-laktamaza i nedavno odobrenim avibaktamom.

Lijek je 2017. odobrila FDA za liječenje kompliciranih infekcija mokraćnog sustava, a 2018. ga je EMA odobrila za liječenje kompliciranih infekcija mokraćnog sustava, kompliciranih intraabdominalnih infekcija, bolničke upale pluća i infekcija koje uzrokuju višestruko-otporne aerobne gram-negativne bakterije (26).

Iako je kratko u primjeni, već je opisano nekoliko mehanizama rezistencije, osobito u enterobakterija otpornih na karbapeneme (KRE). Glavni su mehanizmi rezistencije smanjena propustost stanične membrane (zbog mutacije porina), prekomjerna ekspresija beta-laktamaza te povećana proizvodnja efluksnih pumpi (27).

#### **1.5.4.4. Imipenem/relebaktam**

Relebaktam je novi inhibitor  $\beta$ -laktamaza koji u kombinaciji s imipenemom pokazuje dobru aktivnost protiv određenih sojeva enterobakterija otpornih na karbapeneme. Relebaktam sam po sebi nema antibakterijsko djelovanje, ali inhibira stečene i intrinzične beta-laktamaze.

Djeluje protiv širokog spektra  $\beta$ -laktamaza, uključujući klasu A (kao što su KPC karbapenemaze i  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra), klasu C (AmpC) i određene karbapenemaze klase D, osim enzima OXA-48 (28, 29).

U lipnju 2020. godine FDA je odobrila kombinaciju imipenema i relebaktama za liječenje upale pluća povezane sa strojnom ventilacijom (VAP) i bolničke upale pluća (engl. *hospital-acquired pneumonia*, HAP), što je kasnije odobrila i EMA (28).

#### **1.5.4.5. Plazomicin**

Plazomicin je novi aminoglikozid koji je 2018. FDA odobrila za liječenje kompliciranih infekcija urinarnog trakta, uključujući pijelonefritis koje uzrokuju *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Proteus mirabilis* (30).

Kao i drugi aminoglikozidi, plazomicin se veže za 16S rRNA 30S ribosomske podjedinice, ometajući translaciju proteina. Aktivnost plazomicina *in vitro* pokazuje slične MIK raspone protiv gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija, slično drugim često korištenim aminoglikozidima, kao što su gentamicin, tobramicin i amikacin (31).

Plazomicin je otporan na inaktivaciju enzimima koji modificiraju aminoglikozide (AME), međutim, inaktiviraju ga 16S ribosomalne RNK metiltransferaze (16S-RMT-aze), koje modificiraju ciljno mjesto vezanja antibiotika (30).

Plazomicin djeluje na brojne multirezistentne (MDR) *Enterobacteriaceae*, jer na njegovu aktivnost ne utječu mehanizmi otpornosti na druge klase antibiotika, kao što su  $\beta$ -laktamaze i karbapenemaze, uključujući i metalo- $\beta$ -laktamaze (MBL), kao ni mehanizmi otpornosti na fluorokinolone i kolistin (30).

#### **1.5.4.6. Eravaciklin**

Eravaciklin je novi sintetski fluorciklin (četvrta generacija tetraciklina) koji je 2018. odobrila FDA za liječenje kompliciranih intraabdominalnih infekcija (32). On je posebno dizajniran za prevladavanje uobičajene stečene rezistencije na tetraciklin koja je uzrokovana pojavom efluksnih pumpi te ribosomskim zaštitnim mehanizmima (33). Eravaciklin je pokazao snažnu *in vitro* aktivnost protiv većine gram-pozitivnih i gram-negativnih patogena, uključujući *Enterobacteriaceae* otporne na karbapeneme (32).

Kao i drugi tetraciklini, eravaciklin ispoljava svoje antibakterijsko djelovanje reverzibilnim vezanjem na bakterijsku ribosomsku 30S podjedinicu, čime sprječava ugradnju aminokiselinskih ostataka u izdužene peptidne lance i dovodi do poremećaja sinteze

bakterijskih proteina. Tetraciklini, uključujući eravaciklin, tipično pokazuju bakteriostatsko djelovanje, međutim, eravaciklin također pokazuje baktericidno djelovanje protiv određenih sojeva *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* i *K. pneumoniae in vitro* (33).

Otpornost na eravaciklin kod nekih bakterija povezana je s pojačanom regulacijom nespecifičnog intrinzičnog MDR efluksa i modifikacijom ciljnog mjesta vezanja antibiotika kao što je 16S RNK ili određeni 30S ribosomski proteini (npr. S10). Ne postoji ciljana unakrsna rezistencija između eravaciklina i drugih klasa antibakterijskih lijekova kao što su fluorokinoloni, penicilini, cefalosporini i karbapenemi (33).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je prikazati epidemiološke i mikrobiološke osobitosti karbapenem-rezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* koji su dokazani iz uzoraka donjih dišnih puteva u Kliničkom bolničkom centru (KBC-u) Split u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2022. godine.

## 2.2. Hipoteze

1. Izolati *Klebsiella pneumoniae* koji su rezistentni na karbapeneme, ujedno su rezistentni i na većinu drugih grupa antibiotika.

2. Postoji razlika u osjetljivosti na antibiotike izolata *K. pneumoniae* koji stvaraju OXA-48 i izolata *K. pneumoniae* koji stvaraju KPC.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Izolati**

U istraživanje su uključeni svi izolati *K. pneumoniae* koji su bili rezistentni na karbapeneme i izolirani iz uzoraka donjih respiratornih puteva bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2022. godine, u KBC-u Split.

Analizirana je vrsta uzorka, tip karbapenemske rezistencije, antimikrobna osjetljivost izolata te demografski podatci pacijenata, njihov boravak u bolnici ili izvan bolnice u trenutku uzorkovanja i uputne dijagnoze pacijenata.

Ponavljajući, tkz. „copy“ sojevi izolirani iz uzoraka istog pacijenata su isključeni iz istraživanja.

### **3.2. Mjesto istraživanja**

Podatci su prikupljeni u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i sva istraživanja su obavljena na istom zavodu.

### **3.3. Ustroj istraživanja**

Provedeno je retrospektivno, kohortno, opažajno istraživanje.

### **3.4. Opis istraživanja**

U istraživanje je uključeno ukupno 85 izolata *K. pneumoniae* rezistentnih na karbapeneme. Istraživanje je podijeljeno u faze prikupljanja podataka, njihovu statističku obradu, izradu grafičkih prikaza i tumačenje dobivenih rezultata.

### **3.5. Statistička obrada podataka**

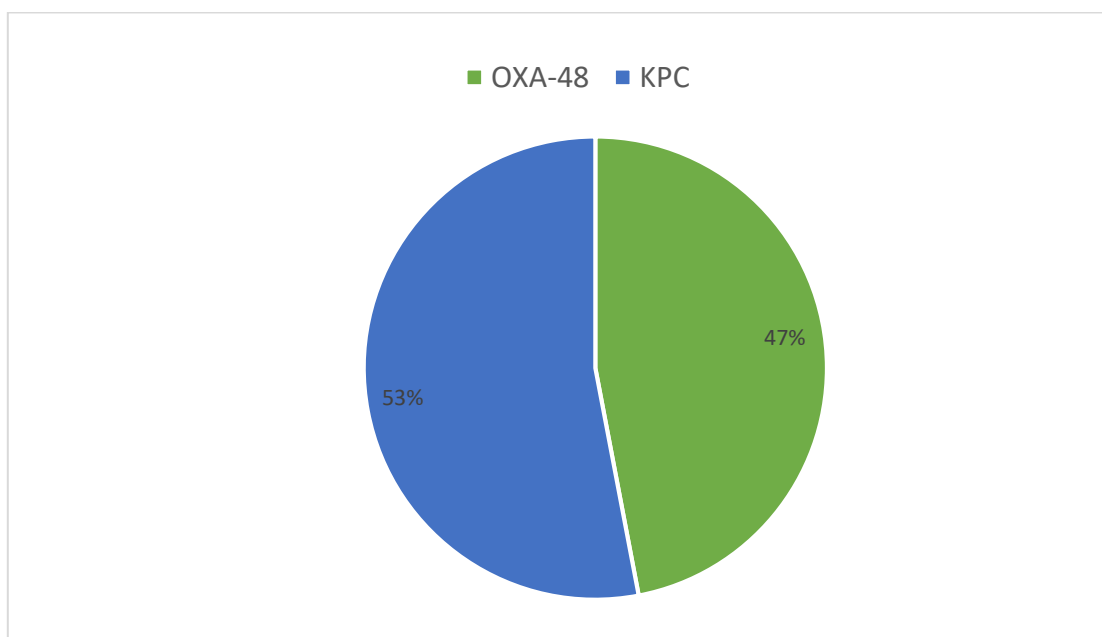
Prikupljeni podatci su obrađeni korištenjem programskog paketa Office 2007 (Microsoft Word za tekstualne i brojčane podatke i Microsoft Excel za slikovne prikaze).

#### **4. REZULTATI**

#### 4.1. Izolati

U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split 2022. godine obrađeno je ukupno 85 karbapenem-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* iz uzoraka donjih dišnih puteva, ispitana im je osjetljivost na antibiotike te je napravljena analiza podataka o pacijentima.

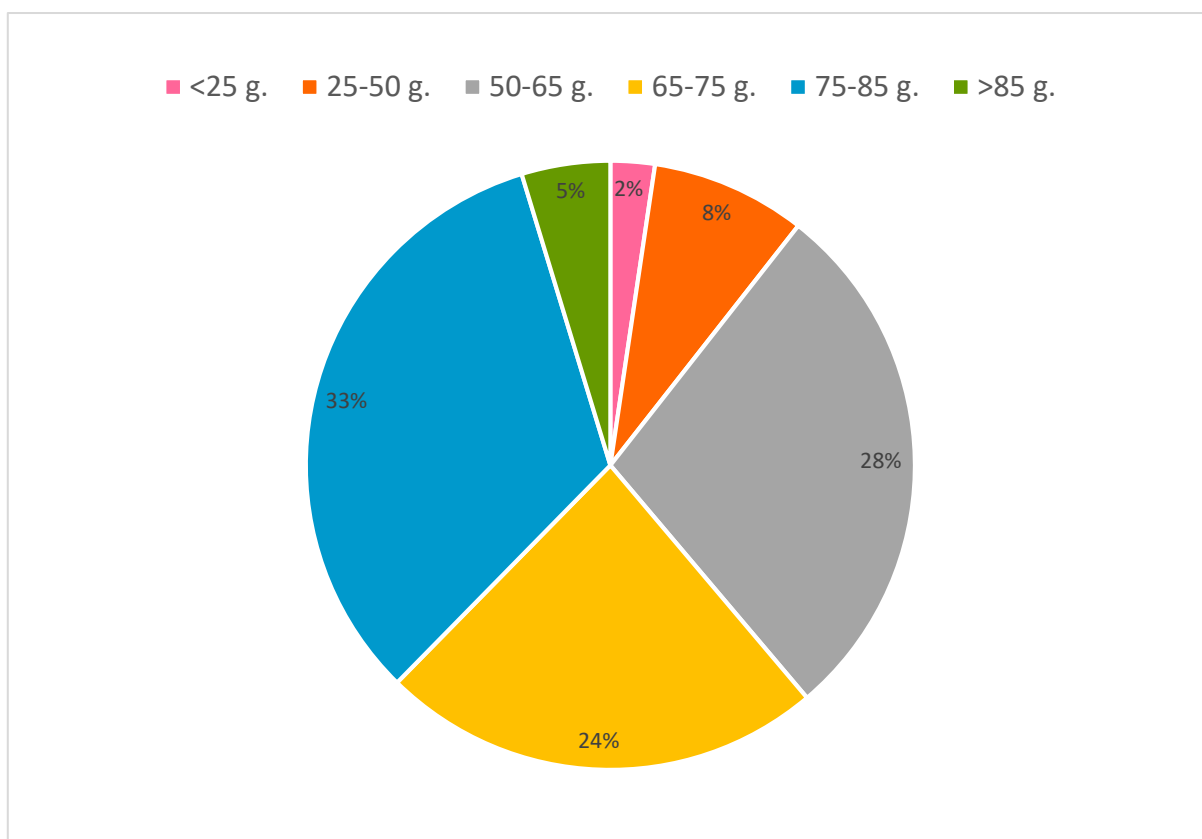
Od ukupnog broja karbapenem-rezistentnih izolata *K. pneumoniae*, OXA-48 producirajućih izolata bilo je 40 (47%), dok je broj KPC producirajućih *K. pneumoniae* bio 45 (53%), kao što prikazuje slika 3.



Slika 3. Raspodjela karbapenem-rezistentnih izolata *K. pneumoniae* po tipu rezistencije.

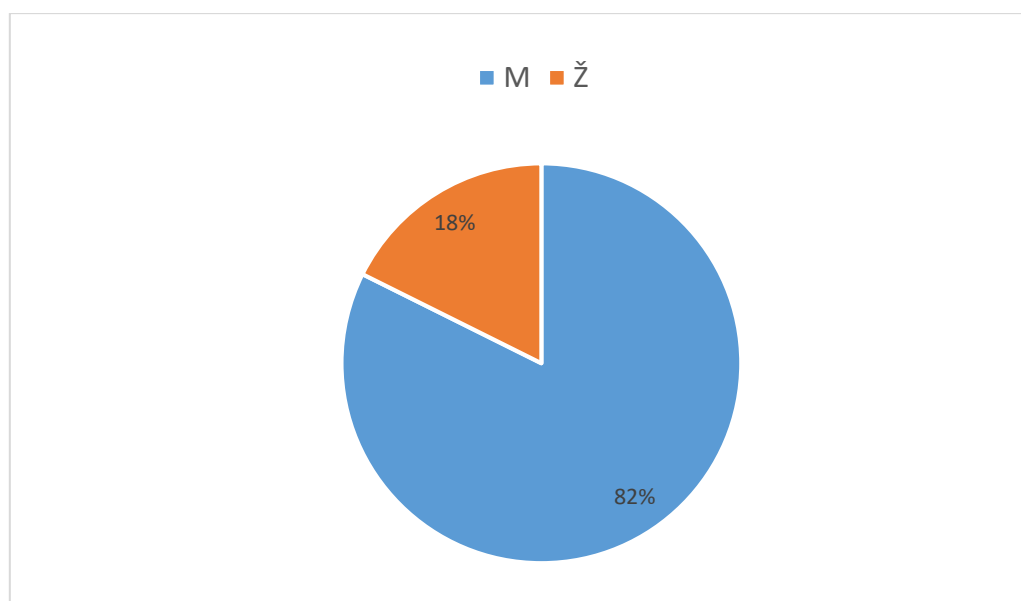
#### 4.2. Demografski podatci

Demografskom obradom pacijenti su raspoređeni u 6 dobnih skupina, kao što prikazuje slika 2. Najviše je bilo pacijenata u dobnim skupinama od 75 do 85 godina (28 pacijenata; 33%), 50 do 65 godina (24 pacijenta; 28%) te od 65 do 75 godina kojih je bilo 20 (24%). U dobnoj skupini od 25 do 50 godina je bilo 7 pacijenata (8%). Najmanje pacijenata je pripadalo najstarijoj i najmlađoj populaciji. Preciznije, svega 4 pacijenta (5%) su bila starija od 85 godina, dok su dva pacijenta (2%) bila mlađa od 25 godina.



Slika 4. Raspodjela pacijenata prema dobnim skupinama.

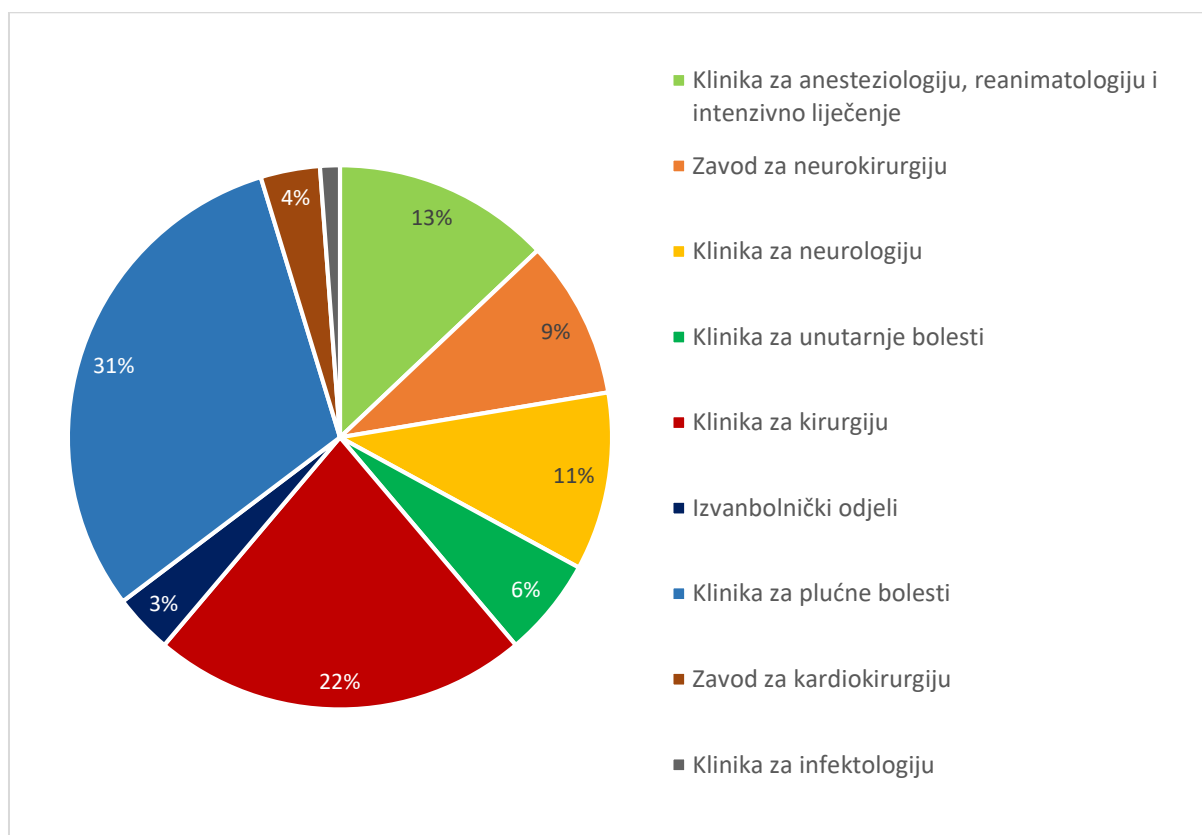
Nadalje, analizom podataka o spolu pacijenata dobiveni rezultat pokazuje prevalenciju muškaraca (70) naspram žena (15) s omjerom 5 : 1. Udio muških ispitanika bio je 82%, dok su žene činile 18%, što se vidi na slici 3.



Slika 5. Raspodjela pacijenata prema spolu.

#### 4.3. Raspodjela pacijenata na bolničku i izvanbolničku populaciju

Podatke o raspodjeli pacijenata prema smještaju na bolničkim odjelima i izvan bolnice u trenutku uzorkovanja, prikazuje slika 4. Od ukupnog broja pacijenata, na Klinici za plućne bolesti se nalazilo 26 (31%), na Klinici za kirurgiju 19 (22%) te na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje 11 (13%) pacijenata. Na Klinici za neurologiju je bilo 9 (11%) pacijenata, a na Zavodu za neurokirurgiju 8 (9%) pacijenata. Najmanje pacijenata je liječeno na Klinici za unutarnje bolesti (5 pacijenata; 6%) i Klinici za infektologiju (1 pacijent; 1%). Troje pacijenata (4%) je pripadalo izvanbolničkoj populaciji (ORL dnevna bolnica, ordinacija DZ Knin i Split).

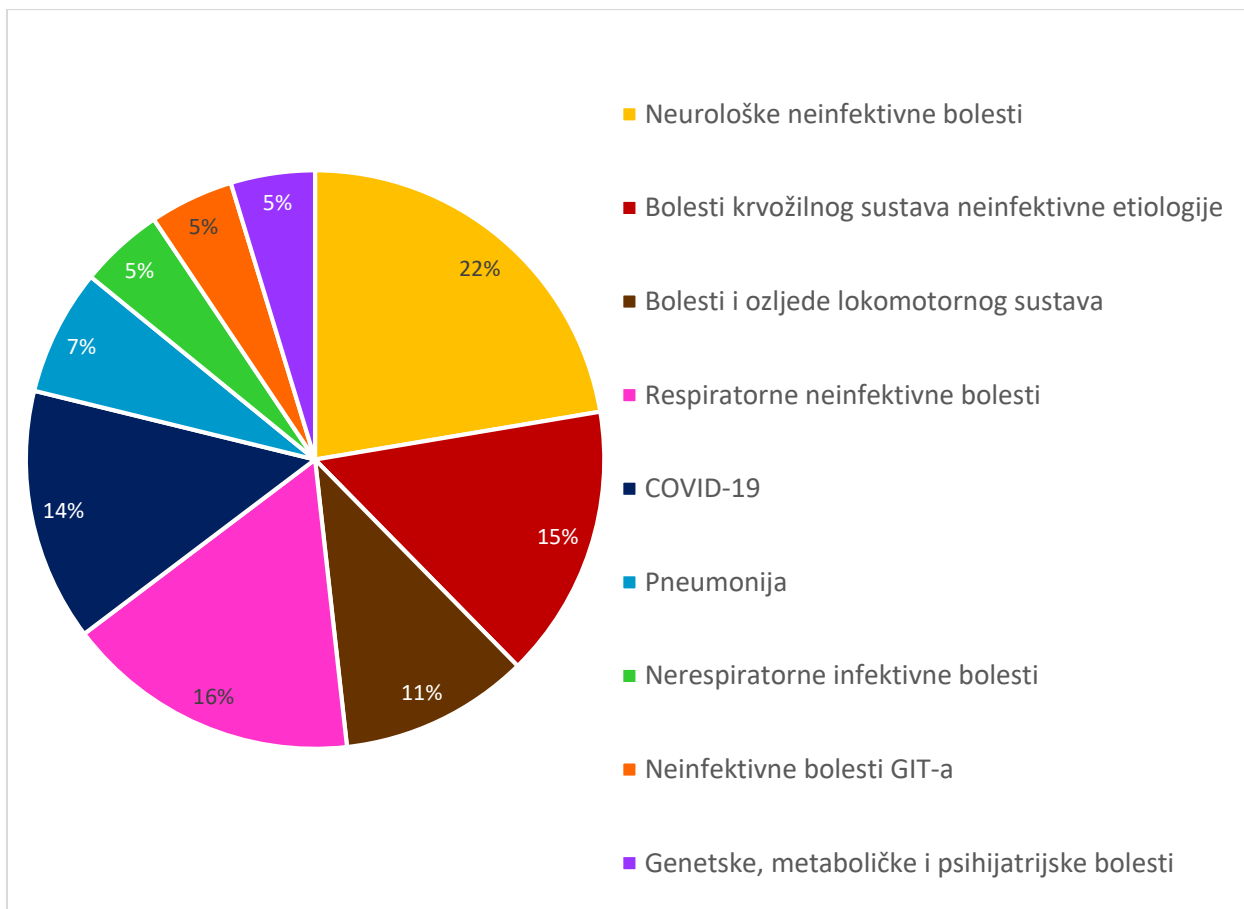


Slika 6. Raspodjela pacijenata prema smještaju na bolničkim odjelima i izvan bolnice.

#### 4.4. Raspodjela pacijenata prema uputnim dijagnozama

Napravljena je raspodjela pacijenata prema uputnim dijagnozama, a rezultati su prikazani na slici 5. Veliku skupinu čine pacijenti s neurološkim i neurokirurškim dijagnozama (poput ozljede mozga, intrakranijskog krvarenja i inzulta), kojih je sveukupno bilo 19 (22%). Značajna je skupina pacijenata s dijagnozama vezanim za respiratorni sustav. Šest pacijenata je imalo pneumoniju (7%), 12 pacijenata (14%) je imalo dijagnozu COVID-19 infekcije, dok je 14 pacijenata (16%) imalo neke druge respiratorne neinfektivne bolesti, kao što su respiracijska

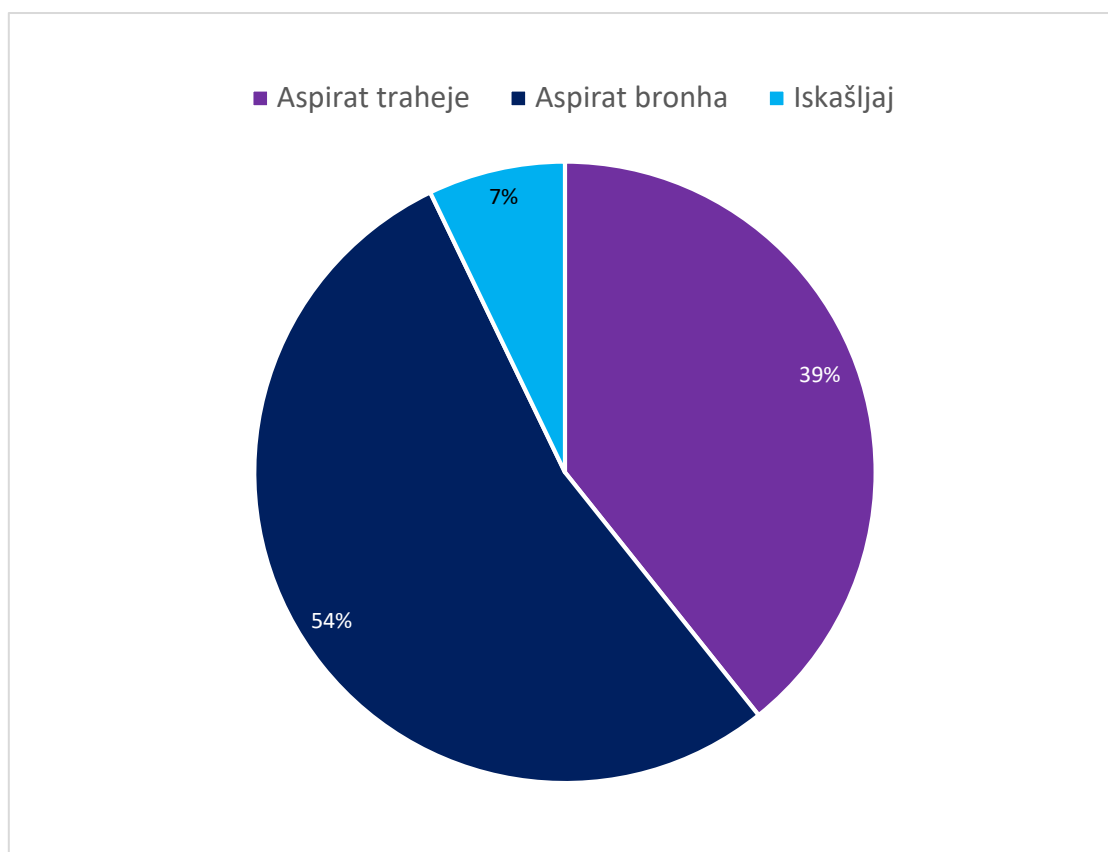
insuficijencija, neoplazme dišnih puteva, plućni edem, pleuralni izljev, pneumotoraks, te zbrinjavanje traheostome. Nešto manja skupina obuhvaća pacijente s dijagnosticiranim bolestima krvožilnog sustava neinfektivne etiologije (13 pacijenata; 15%) te bolestima i ozljedama lokomotornog sustava (9 pacijenata; 11%). Podjednaki broj pacijenata je bio u skupini infektivnih bolesti koje ne obuhvaćaju dišni sustav (poput vrućice nepoznatog uzroka i nefritisa), neinfektivnih bolesti gastrointestinalnog sustava, GIT-a (akutni pankreatitis, bolesti žučnjaka i neoplazme debelog crijeva) te genetskih, metaboličkih i psihijatrijskih bolesti. U svakoj od tih skupina je bilo po 4 pacijenta (5%).



Slika 7. Raspodjela pacijenata prema uputnim dijagnozama.

#### 4.5. Raspodjela uzoraka donjih dišnih puteva iz kojih je izolirana karbapenem-rezistentna *K. pneumoniae*

Izolati karbapenem-rezistentnih *K. pneumoniae* dobiveni su iz uzoraka donjih dišnih puteva. Na slici 6 prikazana je raspodjela tih izolata prema mjestu uzorkovanja. Od 85 uzoraka, najviše je bilo aspirata bronha (45 uzoraka; 53%), zatim aspirata traheje kojih je bilo 33 (39%) te na kraju iskašljaja, kojih je sveukupno bilo 6 što čini 7%.

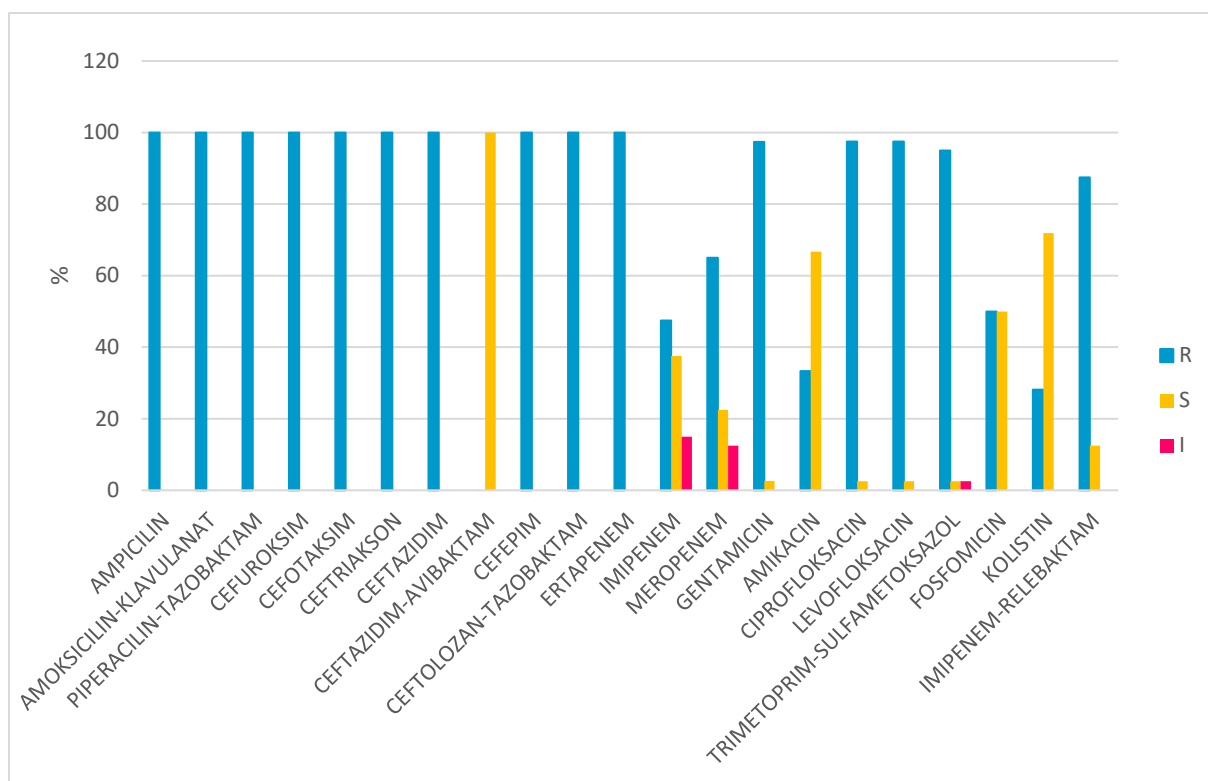


Slika 8. Raspodjela karbapenem- rezistentnih izolata *K. pneumoniae* prema mjestu uzorkovanja.

#### 4.6. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike *K. pneumoniae* OXA-48

Izolatima *K. pneumoniae* koji produciraju OXA-48 ispitana je osjetljivost na antibiotike. Na slici 7 vidimo da je svih 40 testiranih izolata rezistentno na ampicilin, amoksicilin-klavulanat, piperacilin-tazobaktam, cefuroksim, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefepim i ceftolozan-tazobaktam.. Također, svi izolati su rezistentni na ertapenem, dok je 47,5% izolata rezistentno na imipenem te 65% izolata rezistentno na meropenem. Rezistencija na aminoglikozide je najviša na gentamicin (97,4%), dok je 33,3% izolata rezistentno na amikacin. Gotovo svi testirani izolati su rezistentni na fluorokinolone (97,5%) i trimetoprim-sulfametoksazol (95%). Polovina testiranih izolata (50%) je rezistentna na fosfomicin, dok je nešto niža rezistencija zabilježena na kolistin (28,1%). Čak 87,5% izolata je rezistentno na imipenem-relebaktam. Svi izolati su bili potpuno osjetljivi na ceftazidim-avibaktam, tj. nije zabilježena rezistencija OXA-48 producirajućih izolata *K. pneumoniae* na ovu kombinaciju antibiotika i inhibitora  $\beta$ -laktamaza.

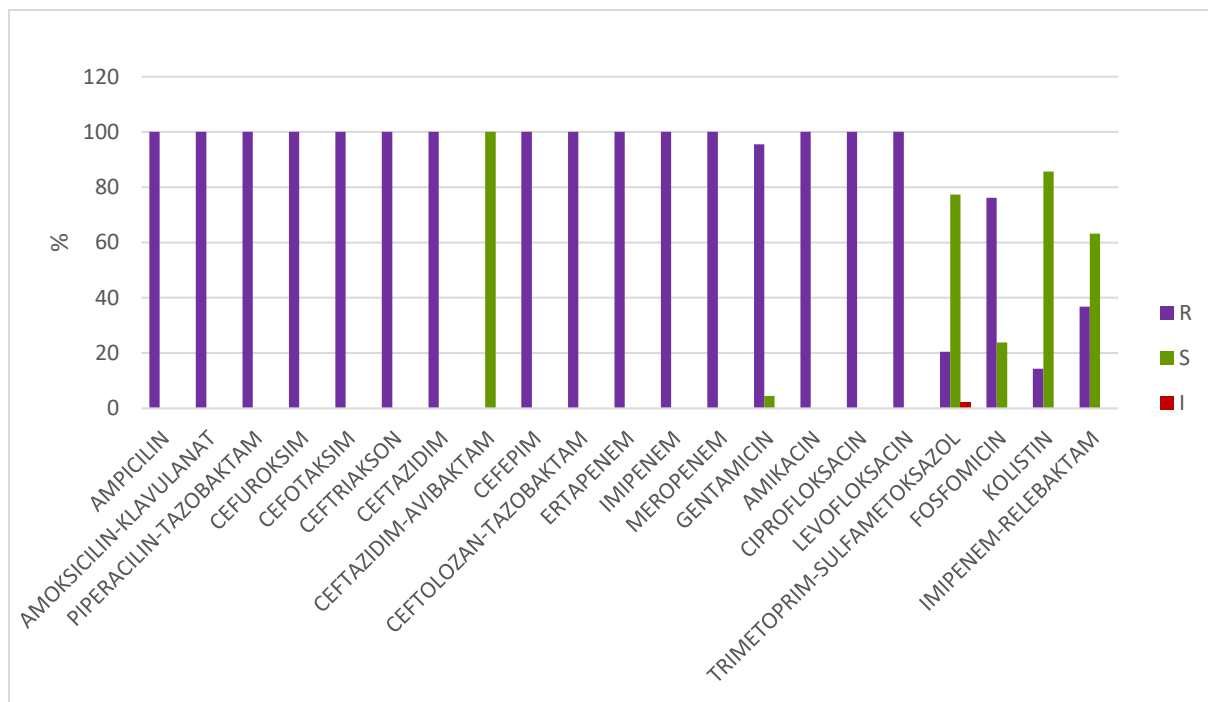




Slika 9. Antimikrobna osjetljivost OXA-48 producirajućih izolata *K. pneumoniae*.

#### 4.7. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike *K. pneumoniae* KPC

Rezultati ispitivanja osjetljivosti svih 45 dokazanih KPC-producirajućih izolata *K. pneumoniae* na antibiotike prikazani su na slici 8. Svi izolati su rezistentni na ampicilin, amoksisicilin-klavulanat, piperacilin-tazobaktam, cefuroksim, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefepim i ceftolozan-tazobaktam. Nasuprot tome, svi izolati su popuno osjetljivi na ceftazidim-avibaktam (100%). Zabilježena je potpuna rezistencija na karbapeneme, tj. svi testirani izolati su rezistentni na ertapenem, meropenem i imipenem. Od ukupnog broja testiranih izolata, njih 36,8% je rezistentno na imipenem-relebaktam. Rezistencija na aminoglikozide je izuzetno visoka; svi izolati su rezistentni na amikacin, a 95,5% izolata je rezistentno na gentamicin. Također, svi testirani izolati su rezistentni na fluorokinolone (ciprofloksacin i levofloksacin). Rezistencija na trimetoprima-sulfometaksazol iznosi 20,5%, a na kolistin, 14,3%. Značajna je rezistencija na fosfomicin (76,2%).



Slika 10. Antimikrobna osjetljivost KPC producirajućih izolata *K. pneumoniae*.

## **5. RASPRAVA**

*Klebsiella pneumoniae* je oportunistički patogen i jedan od najznačajnijih uzročnika bolničkih pneumonija (HAP) u svijetu (1, 3). Uzrokuje 8 do 12% svih pneumonija povezanih sa strujnom ventilacijom, VAP. Smrtnost je visoka, osobito u pacijenata s komorbiditetima (1, 7, 8). VAP je najteža komplikacija infekcije plućnoga parenhima, koja nastaje u jedinicama intenzivnog liječenja (engl. *intensive care unit*, ICU) nakon 48 sati endotrahealne intubacije i mehaničke ventilacije (34).

*K. pneumoniae* je intrinzički otporna na neke vrste  $\beta$ -laktamskih antibiotika (npr. ampicilin), a mehanizam rezistencije je produkcija kromosomskih beta-laktamaza (npr. penicilinaza SHV; sulfhidril varijanta 1) (12). Osim urođene, *K. pneumoniae* može posjedivati i stečenu rezistenciju na  $\beta$ -laktamske antibiotike, koja se prenosi mobilnim genetskim elementima, plazmidima. Među stečenim beta-laktamazama, među najznačajnijima su AmpC beta-laktamaza i beta-laktamaze proširenog spektra (ESBL). Smatra se da su  $\beta$ -laktamaze nastale kao evolucijski odgovor bakterija na prekomjernu primjenu antibiotika (12, 13). Karbapenemi postaju antibiotici izbora u liječenju infekcija uzrokovanih ESBL-producirajućim bakterijama, ali i tzv. MDR bakterijama (35).

Nažalost, s vremenom su bakterije razvile različite mehanizme rezistencije na karbapeneme i smanjile njihovu učinkovitost. Početkom 1990-ih, pojavili su se prvi sojevi *Enterobacteriaceae* otporni na karbapeneme (KRE) i to prvestveno u *K. pneumoniae* (12, 15).

Unutar karbapenemaza klase A klinički je značajna *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza ili KPC, koja je prvo dokazana u SAD-u, odakle se proširila u Europu. Ovaj enzim je kodiran plazmidom, aktivno hidrolizira karbapeneme, a djelomično ga inhibira klavulanska kiselina. *Enterobacteriaceae* koje proizvode KPC stekle su rezistenciju na velik broj beta-laktamskih antibiotika, što ograničava terapijske mogućnosti za liječenje infekcija uzrokovanih ovim bakterijama (15, 16).

U ovom istraživanju, svi testirani KPC-pozitivni izolati *K. pneumoniae* su bili potpuno rezistentni na sve testirane karbapeneme (imipenem, meropenem i ertapenem) i fluorokinolone (ciprofloksacin i levofloksacin).

Paralelno sa širenjem KPC-a u SAD-u i drugdje u svijetu, pojavila se još jedna značajna skupina karbapenemaza, oksacilinaza (OXA), enzim koji izuzetno učinkovito djeluje na peniciline te nešto slabije na karbapeneme i cefalosporine širokog spektra. OXA

karbapenemaze su enzimi Amblerove klase D, a karakterizira ih sposobnost hidrolize kloksacilina ili oksacilina, po čemu su i dobili ime. Prvenstveno se prenose plazmidima, osobito među izolatima *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* i *E. cloacae*. Jedna od klinički najznačajnijih je OXA-48. Izolati *K. pneumoniae* koji stvaraju OXA-48 su se osobito proširili u području Mediterana zadnja dva desetljeća (12, 15, 16).

U ovom istraživanju, svi OXA-48-producirajući izolati *K. pneumoniae* su bili rezistentni na ertapenem, dok je rezistencija na ostale karbapeneme bila niža (47,5% na imipenem te 65% na meropenem).

Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) je 2017. godine proglasila karbapenem-rezistentne enterobakterije jednim od najvećih zdravstvenih prijetnji, a razvoj novih učinkovitih antibiotika najvećim prioritetom. Posljednjih godina, dostupno je nekoliko novih kombinacija  $\beta$ -laktama s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza, kao što su ceftolozan/tazobaktam, ceftazidim/avibaktam i meropenem/vaborbaktam. Osim toga, na raspolaganju su i novi antibiotici širokog spektra djelovanja, kao što su cefiderokol, eravacikin i plazomicin (34).

Sve se više u liječenju koriste kombinacije antibiotika, kako bi se njihovim sinergizmom suprimirao razvoj bakterijske rezistencije i skratilo toksično djelovanje pojedinog antibiotika. Danas se za liječenje VAP-a u visoko rizičnih pacijenata preporuča kombinacija beta-laktamskih antibiotika širokog spektra i fluorokinolona. Kao zadnja terapijska opcija, za liječenje infekcija koje uzrokuju karbapenem-rezistentne enterobakterije, sve se više koristi kolistin koji ima niz ograničenja (slaba učinkovitost u monoterapiji, visoka toksičnost i heterorezistencija) pa se daje u kombiniranoj terapiji s drugim antibioticima (34).

U ovom istraživanju, svi testirani izolati, bez obzira koju vrstu karbapenemaze proizvode (KPC ili OXA-48) su bili potpuno osjetljivi na ceftazidim-avibaktam pa se ova kombinacija beta laktamskog antibiotika i inhibitora stvaranja beta-laktamaza pokazala najučinkovitija i predstavlja lijek izbora za liječenje infekcija uzrokovanih karbapenem-rezistentnim *K. pneumoniae* u KBC-u Split. S druge strane, u svijetu je već opisana rezistencija i na ovu kombinaciju antibiotika. Tako je u istraživanju provedenom u Kini dokazana rezistencija na ceftazidim/avibaktam čak u 40,6% KPC producirajućih izolata *K. pneumoniae*. Rezistencija na ceftazidim/avibaktam pojavila se i prije njihove kliničke uporabe, iako je većina izolata ipak zadržala osjetljivost (36). U Hrvatskoj, rana faza širenja KPC

producirajućih izolata *K. pneumoniae* je prvi put opisana prije sedam godina. Njihovo je širenje bilo ograničeno na u sjevero-zapadnu regiju Hrvatske (37). Širenje OXA-48 producirajućih izolata *K. pneumoniae* prvi put je opisano 2011./2012. godine u multicentričnoj studiji koja je provodila istraživanje od 2010. do 2012. godine te je uključivala deset hrvatskih centara među kojima je i Klinički bolnički centar, Split. Izolati *K. pneumoniae* koji proizvode OXA-48 bili su visoko rezistentni na ertapenem i ciprofloksacin (82,5%), meropenem (47,5%), imipenem (37,5%), dok je osjetljivost na gentamicin i kolistin bila 85, odnosno 98%. Rezistencija tih izolata na fosfomicin bila je 27%, a na sulfametoksazol/trimetoprim čak 60% (38). Ti rezultati još jednom naglašavaju važnost praćenja lokalne rezistencije.

Ograničenje ove studije je kratkoročno praćenje antimikrobne osjetljivosti KPC i OXA-48 producirajućih izolata *K. pneumoniae*. Praćenje promjena antimikrobne osjetljivosti kroz duži vremenski period preporuka je za buduća istraživanja.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Izolati *K. pneumoniae* koji su rezistentni na karbapeneme, ujedno su rezistentni i na većinu ostalih klasa antibiotika.
2. Dokazana je razlika u osjetljivosti na antibiotike izolata *K. pneumoniae* koji stvaraju OXA-48 i izolata *K. pneumoniae* koji stvaraju KPC.
3. Svi testirani izolati *K. pneumoniae* koji produciraju KPC i OXA-48 su rezistentni na ertapenem. Također, svi KPC-producirajući izolati *K. pneumoniae* su potpuno rezistentni i na ostale testirane karbapeneme (imipenem i meropenem), za razliku od OXA-48-producirajući izolata, od kojih je 47,5% rezistentno na imipenem te 65% izolata rezistentno na meropenem.
4. Gotovo jednaka rezistencija KPC-producirajućih izolata (95,5%) i OXA-48-producirajućih izolata (97,4%) je bila prisutna na gentamicin. Veća razlika u rezistenciji postoji na amikacin, tako da su svi KPC-pozitivni izolati i 33,3% OXA-48-pozitivnih izolata rezistentno na amikacin.
5. Svi testirani KPC-pozitivni izolati i 97,5% OXA-48-producirajućih izolata su rezistentni na fluorokinolone.
6. Dokazana je razlika u rezistenciji na trimetoprim-sulfometaksazol; čak 95% OXA-48-producirajućih izolata te 20,5% KPC-producirajućih izolata je rezistentno na ovaj antibiotik.
7. Rezistencija na kolistin iznosi 28,1% za OXA-48-pozitivne izolate i 14,3% za KPC-pozitivne izolate.
8. Značajna je rezistencija KPC-producirajućih izolata na fosfomicin (76,2%), dok je rezistencija OXA-48-pozitivnih izolata nešto niža i iznosi 50%.
9. Dokazana je razlika u rezistenciji na imipenem-relebaktam; 87,5% OXA-48 i 36,8% KPC-producirajućih izolata je rezistentno na ovu kombinaciju.
10. Svi testirani izolati (OXA-48 i KPC) su bili potpuno osjetljivi na ceftazidim-avibaktam.



## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Ashurst JV, Dawson A. Klebsiella Pneumonia. [Updated 2023 Jan 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
2. Tonkić M i sur. Jawetz, Melnick i Adalberg Medicinska mikrobiologija, 26. američko / 1. hrvatsko izdanje. Split: Placebo; 2015.
3. I. Kuzman Pneumonije – uzročnici, dijagnostika, liječenje. Medicinska naklada, Zagreb, 1999. str. 181-3.
4. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP i sur. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:877995.
5. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae* [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2016. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26999397/>
6. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17:6278.
7. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS i sur. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infect Immun. 2021;89:e00693-20.
8. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ i sur. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:483.
9. B. G. Katzung, S. B. Masters, A. J. Trevor Temeljna i klinička farmakologija, 11. izdanje V. Trkulja, M. Klarica, M. Šalković-Petrišić, urednici. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
10. Yakout MA, Ali GH. A novel parC mutation potentiating fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. J Infect Dev Ctries. 2022;16:314-9.
11. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F i sur. Specific patterns of gyrA mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infect Dis. 2013;13:8.
12. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.

13. Jelic M. Mehanizmi rezistencija na antibiotike u enetrobakterija otpornih na karbapeneme. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet ; 2018. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:737644>
14. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86.
15. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med.* 2017;37:303-315.
16. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel).* 2019;8:122.
17. Sato T, Yamawaki K. Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Suppl 7):S538-S543.
18. McCreary EK, Heil EL, Tamma PD. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Cefiderocol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65:e0217120.
19. Mensa J, Barberán J. Cefiderocol. Summary and conclusions. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35 Suppl 2(Suppl 2):45-47.
20. Sanz Herrero F. Ceftazidime-avibactam. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35 Suppl 1(Suppl 1):40-42.
21. Chen Y, Huang HB, Peng JM, Weng L, Du B. Efficacy and Safety of Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Bloodstream Infection: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Microbiol Spectr.* 2022;10:e0260321.
22. Di Bella S, Giacobbe DR, Maraolo AE, Viaggi V, Luzzati R, Bassetti M i sur. Resistance to ceftazidime/avibactam in infections and colonisations by KPC-producing Enterobacterales: a systematic review of observational clinical studies. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;25:268-281.
23. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New  $\beta$ -Lactam- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations. *Clin Microbiol Rev.* 2020;34:e00115-20.
24. Bhowmick T, Weinstein MP. Microbiology of Meropenem-Vaborbactam: A Novel Carbapenem Beta-Lactamase Inhibitor Combination for Carbapenem-Resistant Enterobacterales Infections. *Infect Dis Ther.* 2020;9:757-767.
25. Dhillon S. Meropenem/Vaborbactam: A Review in Complicated Urinary Tract Infections. *Drugs.* 2018;78:1259-1270.

26. Tumbarello M, Raffaelli F, Cascio A, Falcone M, Signorini L, Mussini C i sur. Compassionate use of meropenem/vaborbactam for infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a multicentre study. *JAC Antimicrob Resist.* 2022;4:dla022.
27. Gaibani P, Giani T, Bovo F, Lombardo D, Amadesi S, Lazzarotto T i sur. Resistance to Ceftazidime/Avibactam, Meropenem/Vaborbactam and Imipenem/Relebactam in Gram-Negative MDR Bacilli: Molecular Mechanisms and Susceptibility Testing. *Antibiotics (Basel).* 2022;11:628.
28. Girón RM, Ibáñez A, Gómez-Punter RM, Alarcón T. New evidence in severe pneumonia: imipenem/ cilastatin/relebactam. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35 Suppl 1(Suppl 1):46-49.
29. Hernández-García M, García-Castillo M, Bou G, Cercenado E, Delgado-Valverde M, Oliver A i sur. Imipenem-Relebactam Susceptibility in *Enterobacteriales* Isolates Recovered from ICU Patients from Spain and Portugal (SUPERIOR and STEP Studies). *Microbiol Spectr.* 2022;10:e0292722.
30. Serio AW, Keepers T, Krause KM. Plazomicin Is Active Against Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6:ofz123.
31. Golkar T, Bassenden AV, Maiti K, Arya DP, Schmeing TM, Berghuis AM. Structural basis for plazomicin antibiotic action and resistance. *Commun Biol.* 2021;4:729.
32. Xu C, Wei X, Jin Y, Bai F, Cheng Z, Chen S i sur. Development of Resistance to Eravacycline by *Klebsiella pneumoniae* and Collateral Sensitivity-Guided Design of Combination Therapies. *Microbiol Spectr.* 2022;10:e0139022.
33. Scott LJ. Eravacycline: A Review in Complicated Intra-Abdominal Infections. *Drugs.* 2019;79:315-324.
34. Ramadan RA, Bedawy AM, Negm EM, Hassan TH, Ibrahim DA, ElSheikh SM i sur. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Among Patients with Ventilator-Associated Pneumonia: Evaluation of Antibiotic Combinations and Susceptibility to New Antibiotics. *Infect Drug Resist.* 2022;15:3537-3548.
35. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG i sur. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268-81.

36. Zhang P, Shi Q, Hu H, Hong B, Wu X, Du X i sur. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26:124.e1-124.e4.
37. Jelic M, Butic I, Plecko V, Cipris I, Jajic I, Bejuk D i sur. KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Croatia: A Nationwide Survey. *Microb Drug Resist.* 2016;22:662-7.
38. Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A i sur. Epidemic spread of Oxa-48 beta-lactamase in Croatia [Internet]. *Microbiology Society*; 2018. Dostupno na: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000777#tab2>

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj istraživanja je prikazati epidemiološke i mikrobiološke osobitosti karbapenem-rezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* koji su dokazani iz uzoraka donjih dišnih puteva u Kliničkom bolničkom centru (KBC-u) Split u razdoblju od 1. siječnja do 31. prosinca 2022. godine.

**Materijali i metode:** U ovom retrospektivnom, opažajnom istraživanju analizirani su podaci o svim izolatima *K. pneumoniae* koji su bili rezistentni na karbapeneme i izolirani iz uzoraka donjih respiratornih puteva, bolničkih i izvanbolničkih pacijenata, u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju, KBC-a Split, u periodu istraživanja.

**Rezultati:** Ukupno je analizirano 85 karbapenem-rezistentnih izolata *K. pneumoniae*, od kojih je 40 produciralo oksacilinazu-48 (OXA-48), a 45 izolata je produciralo *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazu (KPC). Dokazana je razlika u osjetljivosti na antibiotike između ove dvije grupe izolata. Svi testirani izolati *K. pneumoniae* koji produciraju KPC i OXA-48 su rezistentni na ertapenem. Također, svi KPC-producirajući izolati su potpuno rezistentni i na ostale testirane karbapeneme (imipenem i meropenem), za razliku od OXA-48-producirajući izolata, od kojih je 47,5% rezistentno na imipenem te 65% izolata rezistentno na meropenem. Svi testirani KPC izolati i 97,4% OXA-48 izolata je rezistentno na amikacin, dok je 95,5% KPC i 33,3% OXA-48 izolata rezistentno na gentamicin. Svi testirani KPC i 97,5% OXA-48 izolata su rezistentni na fluorokinolone. Na trimetoprim-sulfometaksazol je rezistentno 95% OXA-48 i 20,5% KPC izolata. Rezistencija na kolistin iznosi 28,1% za OXA-48 i 14,3% za KPC izolate. Rezistencija na fosfomicin je 76,2% za KPC i 50% za OXA-48 izolate. Na imipenem-relebaktam je rezistentno 87,5% OXA-48 i 36,8% KPC izolata. Svi testirani izolati (OXA-48 i KPC) su osjetljivi na ceftazidim-avibaktam.

**Zaključak:** Konstantno ispitivanje i praćenje antimikrobne osjetljivosti je iznimno važno kako bi se pravovremeno primijenila učinkovita antimikrobna terapija. Prema rezultatima ovog istraživanja, ceftazidim-avibaktam predstavlja najbolju terapijsku opciju za liječenje infekcija koje uzrokuju karbapenem-rezistentni sojevi *K. pneumoniae* (bez obzira je li mehanizam rezistencije produkcija KPC ili OXA-48) u KBC-u Split.

## **9. SUMMARY**



**Objectives:** The aim of the research is to determine the epidemiological and microbiological characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* which was isolated from lower respiratory tract samples of patients at the University Hospital of Split (UHS) in the period from January 1st to December 31st, 2022.

**Materials and methods:** This retrospective, observational study evaluated characteristics of all isolates of *K. pneumoniae* that were resistant to carbapenems and isolated from samples of the lower respiratory tract of inpatients and outpatients at the Department of Microbiology and Parasitology, University Hospital of Split, during the research period.

**Results:** A total of 85 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were analyzed, out of which 40 produced OXA-48, and 45 isolates produced KPC. The difference in sensitivity to antibiotics was demonstrated between these two groups of isolates. All KPC- and OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates tested were resistant to ertapenem. Also, all KPC-producing isolates were resistant to other tested carbapenems (imipenem and meropenem), unlike OXA-48-producing isolates, out of which 47.5% were resistant to imipenem and 65% of isolates were resistant to meropenem. All tested KPC isolates and 97.4% of OXA-48 isolates were resistant to amikacin. while 95.5% of KPC and 33.3% of OXA-48 isolates were resistant to gentamicin. All tested KPC and 97.5% of OXA-48 isolates were resistant to fluoroquinolones. 95% of OXA-48 and 20.5% of KPC isolates were resistant to trimethoprim-sulfometaxazole. Resistance to colistin was 28.1% for OXA-48 and 14.3% for KPC isolates. Fosfomycin resistance was 76.2% for KPC and 50% for OXA-48 isolates. 87.5% of OXA-48 and 36.8% of KPC isolates were resistant to imipenem-relebactam. All tested isolates (OXA-48 and KPC) are susceptible to ceftazidime-avibactam.

**Conclusion:** Taken together, these data highlight the importance of constant examination and monitoring of antimicrobial susceptibility in order to apply effective antimicrobial therapy in a timely manner. According to the results of this research, ceftazidime-avibactam is the best therapeutic option for the treatment of infections caused by carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae* (regardless of whether the mechanism of resistance is the production of KPC or OXA-48) at the University Hospital of Split.



