

# In vitro aktivnost nitroksolina prema višestruko otpornim enterobakterijama

---

**Maleš, Dominik**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:171:190877>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**Dominik Maleš**

***IN VITRO* AKTIVNOST NITROKSOLINA PREMA VIŠESTRUKO OTPORNIM  
ENTEROBAKTERIJAMA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.**

**Split, srpanj 2024.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Antimikrobna otpornost</b> .....	2
<b>1.2 Mehanizmi otpornosti na antibiotike</b> .....	2
<b>1.2.1 Beta laktamaze</b> .....	3
<b>1.2.2 Karbapenemaze</b> .....	3
<b>1.3 Enterobakterije</b> .....	4
<b>1.4 Enterobakterije kao prijetnja ljudskom zdravlju</b> .....	5
<b>1.4.1 <i>K. pneumoniae</i></b> .....	5
<b>1.4.2 <i>E. coli</i></b> .....	8
<b>1.5 Nitroksolin</b> .....	8
<b>1.5.1 Mehanizam djelovanja</b> .....	9
<b>1.5.2 Farmakokinetika i farmakodinamika</b> .....	10
<b>1.5.3 Antifungalna, antiviralna i antiparazitarna aktivnost</b> .....	10
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	11
<b>2.1 Cilj istraživanja</b> .....	12
<b>2.2 Hipoteze</b> .....	12
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	13
<b>3.1. Disk-difuzija (Kirby-Bauer metoda)</b> .....	14
<b>3.1.1 ESBL test</b> .....	15
<b>3.1.2 Detekcija karbapenemaza</b> .....	15
<b>3.2 Metoda mikrodilucije u bujonu</b> .....	16
<b>3.2.1 Priprema i skladištenje razrijeđene antimikrobne tvari</b> .....	16
<b>3.2.2 Priprema inokuluma i inokulacija</b> .....	17
<b>3.2.3 Inkubacija</b> .....	17
<b>3.2.4 Određivanje krajnjih točaka minimalne inhibitorne koncentracije</b> .....	17
<b>3.2.5 Mueller Hinton bujon</b> .....	18
<b>4. REZULTATI</b> .....	20
<b>4.1 Obilježja prikupljenih sojeva</b> .....	21
<b>4.2 Demografska obilježja ambulantnih bolesnika</b> .....	21
<b>4.3 Otpornost izolata na antibiotike</b> .....	23
<b>4.3.1 <i>E. coli</i></b> .....	23
<b>4.3.2 <i>K. pneumoniae</i></b> .....	24
<b>4.4 Rezultati antimikrobne aktivnosti nitroksolina</b> .....	26
<b>4.4.1 <i>E. coli</i></b> .....	26
<b>4.4.2 <i>K. pneumoniae</i></b> .....	27
<b>5. RASPRAVA</b> .....	28
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	32

<b>7. LITERATURA</b> .....	34
<b>8. SAŽETAK</b> .....	42
<b>9. SUMMARY</b> .....	44

## **ZAHVALE**

*Od srca se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Merici Carev, dr. med., na beskrajnoj podršci, savjetima i uloženom trudu, na ispravljanju svih mojih pravopisnih grešaka i na svemu što me naučila. Hvala Vam.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Zvonimiru Barišiću, dr. med., doc. dr. sc. Katarini Šiško Kraljević, dr. med., Paulu Bohnertu, dr. med. i posebice cijenjenoj Mirandi Režić, med. lab. teh., koji su pomogli u prikupljanju i pohrani sojeva te prikupljanju podataka koji su korišteni u istraživanju. Bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Zahvaljujem obitelji i prijateljima na podršci i ljubavi.*

*Hvala Apolonu, Asklepiju, Higijeji i Zemlji.*

## **POPIS KRATICA**

AMC – amoksicilin-klavulanat

AMI – amikacin

AMO – amoksicilin

AMR – antimikrobna otpornost

CDC – Centar za kontrolu i prevenciju bolesti

CIP – ciprofloksacin

CIX – cefiksim

CLE – cefaleksin

CLSI – Institut za kliničke i laboratorijske standarde

CTR – ceftriakson

CTV – ceftazidim u kombinaciji s avibaktamom

CTZ – ceftazidim

CUR – cefuroksim

DMSO – dimetil sulfoksid

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

ERT – ertapenem

ESBL – beta laktamaze proširenog spektra

EUCAST - Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti

FOS – fosfomicin

GEN – gentamicin

IMI – imipenem

IMS – infekcije mokraćnog sustava

IQR – interkvartilni raspon

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

KA – krvni agar

KBC – Klinički bolnički centar

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

MDR – višestruka otpornost na antibiotike

MER – meropenem

MHA – Mueller Hinton agar

MHB – Mueller Hinton bujon

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

NIT – nitrofurantoin

NOR – norfloksacin

NTX – nitroksolin

NZJZ SDŽ – Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije

PDR - otpornost na sve dostupne antibiotike

SAD – Sjedinjene Američke Države

SZO – Svjetska Zdravstvena Organizacija

TRS – trimetoprim-sulfametaksazol

XDR – ekstenzivna otpornost na antibiotike

## **1. UVOD**



## 1.1 Antimikrobna otpornost

Otkriće i uvođenje antibiotika u kliničku praksu tijekom dvadesetog stoljeća predstavlja jedno od najvažnijih postignuća u medicini. Rezultiralo je izlječenjem dotada neizlječivih infekcija, produljenjem očekivanog životnog vijeka i otvorilo je vrata mnogim medicinskim intervencijama (1). Nažalost, neprikladno i prekomjerno korištenje antibiotika potaklo je razvoj bakterijske otpornosti na antibiotike, a dugogodišnja posljedica toga je globalni problem antimikrobne otpornosti (*engl. antimicrobial resistance*, AMR) (1-3). Antimikrobna otpornost predstavlja jedan od dominantnih globalnih javnozdravstvenih problema sadašnjice (4-6). Posljedice su terapijska neučinkovitost antimikrobnih lijekova sa povećanim morbiditetom i mortalitetom te negativnim utjecajem na okoliš (2, 3, 6). Procjenjuje se da je AMR uzrokovala 1,27 milijuna smrti te da je doprinijela u 4,95 milijuna smrti u 2019. godini (7).

Osim toga, AMR ima značajne nepovoljne ekonomske utjecaje zbog povećanja troškova liječenja unutar zdravstvenog sustava, smanjenja raspoloživosti radne snage i ometanja međunarodne trgovine. Predviđa se da će do 2050. godine AMR smanjiti globalni bruto domaći proizvod za barem 1,1 posto, a oporavak od ekonomske štete odvijat će se sporo i trajat će desetljećima. Ovi podaci su usporedivi sa financijskom krizom 2008-2009. godine, ali za razliku od nje, države u razvoju bit će teže pogođene u odnosu na razvijene države te će oporavak trajati desetljećima (8).

## 1.2 Mehanizmi otpornosti na antibiotike

Antimikrobna otpornost može se pojaviti u obliku stečene otpornosti ili kao prirođena otpornost na antibiotike. Prirođena otpornost je kodirana u bakterijskom kromosomu, a stečena se ostvaruje mutacijama i stjecanjem novog genetskog materijala u obliku plazmida ili fragmenata DNA (9, 10).

Mehanizmi kojima bakterije stvaraju otpornost na antibiotike su:

1. Enzimska razgradnja ili modifikacija antibiotika;
2. Mijenjanje ciljne molekule na koju antibiotik djeluje;
3. Smanjenje propusnosti membrane čime se otežava ili onemogućava antibiotiku da prođe u stanicu;
4. Izbacivanje antibiotika iz stanice (9, 10).

Prekomjerna i neracionalna uporaba antibiotika izazvala je evolucijski pritisak na bakterije da ubrzano razvijaju mehanizme otpornosti omogućavajući im da prežive. Osjetljive bakterije odumiru u prisutnosti antibiotika dok otporne bakterije imaju veću vjerojatnost

preživljenja i daljnjeg razmnožavanja. Ovim načinom gube se osjetljive bakterije iz okoliša, a prevladavaju i napreduju one koje su otporne (3, 10). Zdravstveni i prehrambeni sektor koriste ogromne količine antibiotika zbog čega najviše pridonose razvoju antimikrobne otpornosti, a osim toga zagađuju vodu antibioticima što povećava broj otpornih sojeva u okolišu što posljedično pridonosi problemu AMR (3).

### **1.2.1 Beta laktamaze**

Beta laktamaze su enzimi koji omogućuju bakterijama da razgrađuju beta laktamske antibiotike i time ostvaruju otpornost na njih (11). Beta laktamski antibiotici su najčešći pripisivani antibiotici (12). Dijelimo ih na peniciline, cefalosporime, karbapeneme i monobaktame, a svima im je zajednička prisutnost beta laktamskog prstena u kemijskoj strukturi (12-15). Svoj učinak ostvaruju ometanjem gradnje stanične stijenke (12, 14, 16, 17).

Beta laktamaze svoj učinak ostvaruju hidrolizacijom beta laktamskog prstena što rezultira inaktivacijom antibiotika (14, 16). Mogu se klasificirati prema Ambleru ili prema Bush-Jacobysustavu klasifikacije. Bush-Jacoby sustav klasificira ih prema skupini antibiotika koje učinkovito razgrađuju i prema interakciji sa inhibitorima beta laktamaza (16). Ambler sustav ih klasificira prema kemijskoj strukturi u kategorije A, B, C i D (14, 16). Klase A, C i D koriste aminokiselinu serin za acilaciju i posljedičnu hidrolizaciju beta laktamskog prstena zbog čega se nazivaju i serinskim beta laktamazama (14, 16, 18).

Klasa B sastoji se od metalo-beta-laktamaza koje koriste ione cinka za uništavanje beta laktamskog prstena (11, 14, 16, 18). Budući da ovise o ionima cinka za ostvarenje svog učinka osjetljive su na kelatore divalentnih kationa kao što je etilen-diamin-tetraoctena kiselina (*engl. ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA). Vezanjem divalentnih kationa, EDTA inhibira ovu skupinu beta laktamaza (11, 16). Bakterije konjugacijom mogu prenesti gene koji kodiraju metalo-beta-laktamaze zbog čega je ovaj tip otpornosti proširen po cijelom svijetu (19).

### **1.2.2 Karbapenemaze**

Karbapenemaze su beta laktamaze sa najširim spektrom djelovanja. Učinkovito hidroliziraju beta laktamski prsten penicilina, cefalosporina, karbapenema i monobaktama. Karbapenemaze dijelimo u klase A, B, C i D. Enterobakterije stvaraju otpornost na karbapeneme proizvodnjom karbapenemaza iz klase A ili OXA-48 beta laktamaze koja pripada klasi D (19).

Klasa A uključuje razne porodice karbapenemaza kao što su SME, IMI, NMC-A, GES i KPC (19). KPC su klinički najznačajnije karbapenemaze i proširene su po cijelom svijetu (14).

Prvi put se pojavljuju 1996. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) među sojevima *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Uzrokuju otpornost na širok spektar antibiotika uključujući cefalosporine treće i četvrte generacije, aztreonam, imipenem i meropenem (19). Mnogi inhibitori beta laktamaza ne pokazuju učinkovitu inhibiciju KPC karbapenemaza, ali su osjetljive na inhibitorni učinak avibaktama (14).

Klasa D sastoji se od oksacilinaza nazvanim po svojoj sposobnosti da hidroliziraju oksacilin (20). Ova klasa uključuje karbapenemazu OXA-48 koja se prvi put pojavila 2007. godine u Turskoj među sojevima *K. pneumoniae* (16, 19). Danas je proširena na više kontinenata, a može se širiti konjugacijom budući je kodirana na plazmidima (14, 16). Osim karbapenema učinkovito razgrađuje i ostale beta laktamske antibiotike od kojih su od posebne važnosti cefalosporini treće i četvrte generacije (19).

Prije se smatralo da klasa C beta laktamaza ne sadržava karbapenemaze, odnosno da enzimi u toj skupini posjeduju jako malu aktivnost razgradnje karbapenema (13). Međutim, 2006. godine je izolirana karbapenemaza klase C kodirana na plazmidu koja učinkovito razgrađuje imipenem (21).

### 1.3 Enterobakterije

*Enterobacteriaceae* su porodica gram negativnih fermentativnih bakterija koja uključuje važne patogene kao što su *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Klebsiella pneumoniae*. Klinički su značajne jer spadaju među česte uzročnike nozokomijalnih infekcija i znatno pridonose globalnom morbiditetu i mortalitetu (22).

Enterobakterije ostvaruju otpornost na beta laktamske antibiotike proizvodnjom beta laktamaza, izbacivanjem antibiotika kroz crpke na staničnoj membrani i promjenom mjesta vezanja beta laktamskih antibiotika. Povećana ekspresija gena koji kodiraju beta laktamaze i produkcija beta laktamaza proširenog spektra (*eng. extended spectrum beta-lactamase*, ESBL) omogućila im je proširenje rezistencije na cefalosporine treće generacije (20).

Rastuća otpornost na peniciline i cefalosporine potakla je sve učestalije korištenje karbapenema kao terapijskog izbora za liječenje infekcija uzrokovanih enterobakterijama. Posljedica toga je veća proširenost enterobakterija otpornih na karbapeneme uvjetovanog već prije spomenutim mehanizmom evolucijskog pritiska. (23, 24). Proizvodnja karbapenemaza omogućila je enterobakterijama razgradnju karbapenema, beta laktamskih antibiotika sa najširim spektrom (19).

## 1.4 Enterobakterije kao prijetnja ljudskom zdravlju

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2017. godine objavila listu prioriternih patogena za koje je potrebno razvijanje i otkrivanje novih antibiotika. Na toj listi *Enterobacteriaceae* otporne na karbapeneme i *Enterobacteriaceae* koje proizvode beta laktamazu proširenog spektra navedene su kao kritično prioritarna skupina (25). Dvije godine kasnije Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (*engl. Centers for Disease Control and Prevention, CDC*) navodi *Enterobacteriaceae* otporne na karbapeneme kao hitnu prijetnju ljudskom zdravlju (6).

*E. coli* otporna na cefalosporine treće generacije i *K. pneumoniae* otporna na karbapeneme spadaju među tri najvažnija uzročnika infekcija koji opterećuju zdravstveni sustav u području Europe (5).

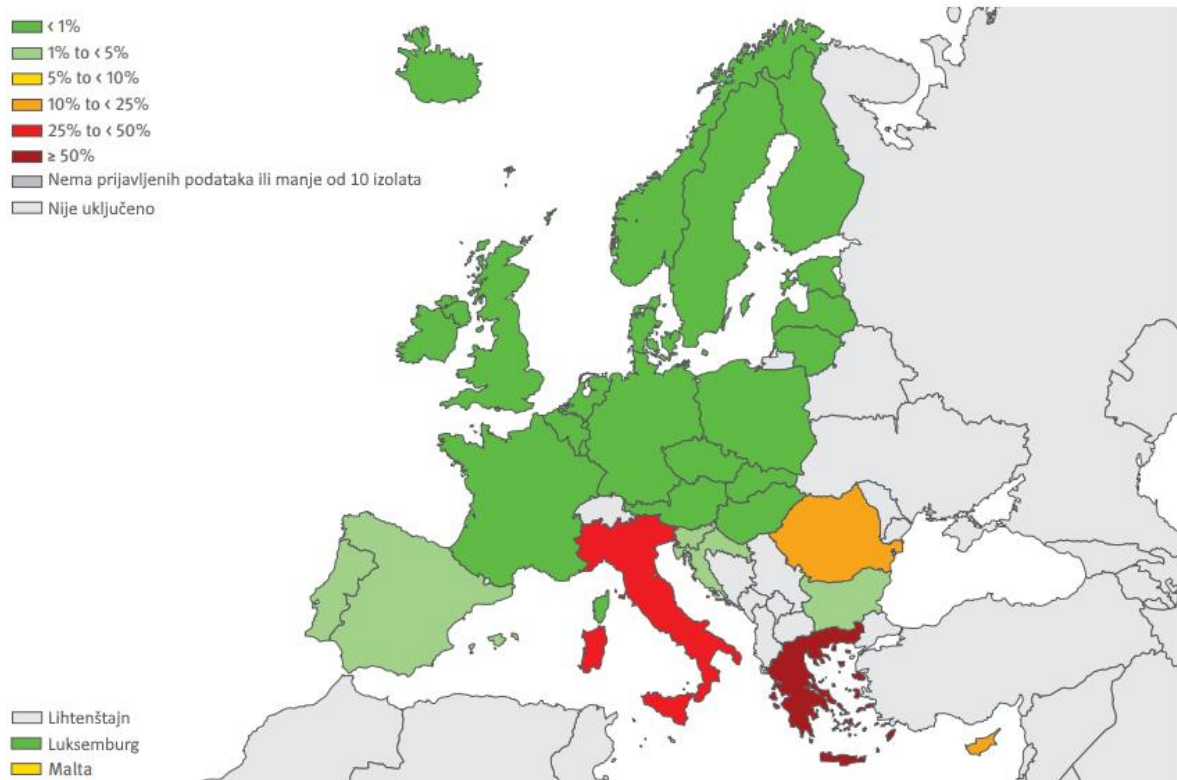
Enterobakterije su važni uzročnici nozokomijalnih infekcija i sklone su višestrukoj otpornosti. Višestruka otpornost (*engl. multidrug-resistant, MDR*) definira se kao neosjetljivost na barem jednu antimikrobnu tvar iz tri ili više skupina antimikrobnih tvari. Ekstenzivna otpornost (*engl. extensively drug-resistant, XDR*) definira se kao neosjetljivost na barem jednu antimikrobnu tvar u svim osim dvije ili manje skupina antimikrobnih tvari. Otpornost na sve dostupne antibiotike (*engl. pandrug-resistant, PDR*) definira se kao neosjetljivost na sve antimikrobne tvari iz svih skupina antimikrobnih tvari. Neosjetljivost na antimikrobnu tvar podrazumijeva rezultat otpornosti ili umjerene osjetljivosti u *in vitro* ispitivanju antimikrobne osjetljivosti bakterijskih sojeva (26).

### 1.4.1 *K. pneumoniae*

Europa bilježi porast otpornosti *K. pneumoniae* na karbapeneme, a gotovo uvijek su ti sojevi otporni i na druge skupine antibiotika ograničavajući terapijske opcije (5). Smatra se da su sojevi *Klebsiella* spp. otporne na karbapeneme zaslužne za preko četiri tisuće smrti u Europskoj Uniji u 2020. godini (27, 28). Otkriveni su i novi sojevi hipervirulentne *K. pneumoniae* koja posjeduje gene za karbapenemazu. Ovi sojevi predstavljaju ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju ukoliko se ne otkriju na vrijeme i ako se ne spriječi njihovo širenje (5).

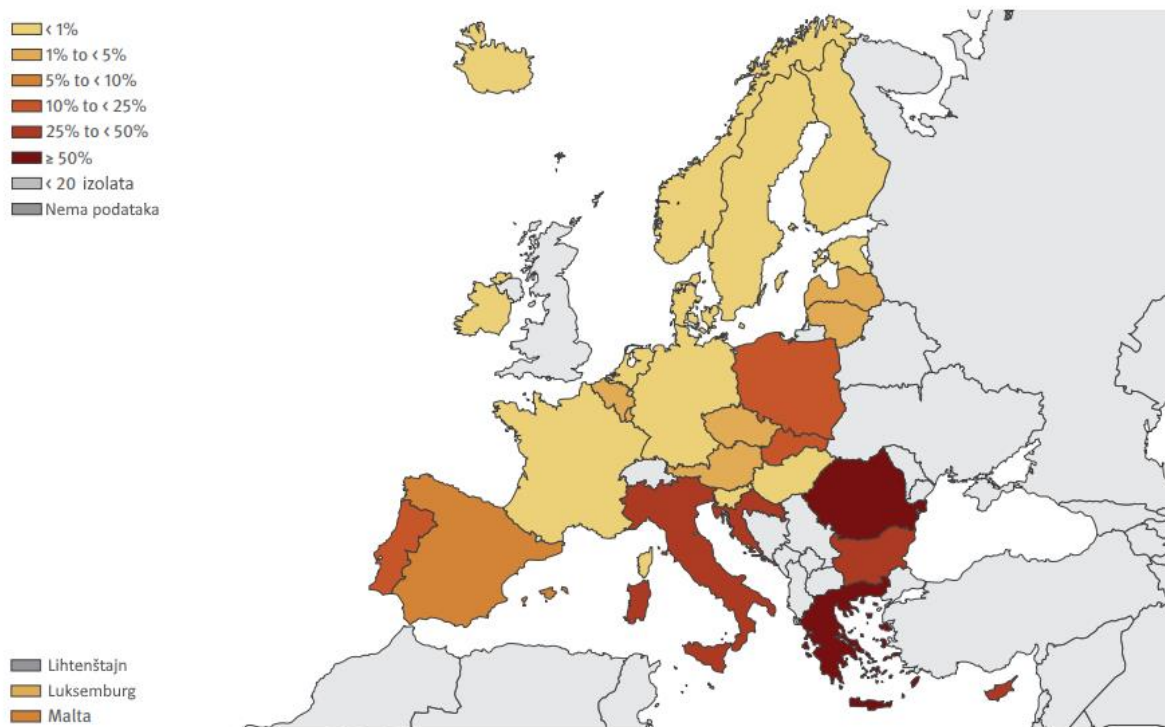
Među državama Europske Unije Hrvatska bilježi značajan porast otpornosti na karbapeneme. (5, 29). Hrvatska u razdoblju od 2017. do 2021. godine bilježi porast otpornosti *Klebsiella pneumoniae* na cefalosporine treće generacije, karbapeneme, fluorokinolone, aminoglikozide i višestruku otpornost na 3 antibiotske skupine (cefalosporini treće generacije, fluorokinoloni i aminoglikozidi). Prema podacima Odbora za praćenje rezistencije bakterija na

antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2015. godini otpornost *K. pneumoniae* na imipenem i meropenem bila je 1% za oba karbapenemska antibiotika (30). Otpornost *K. pneumoniae* u 2022. godini na imipenem bila je 9%, a otpornost na meropenem 13% što ukazuje na porast i širenje otpornosti (31).



**Slika 1.** Postotak otpornosti *K. pneumoniae* na karbapeneme u Europskim državama, 2015. Preuzeto i prilagođeno iz: European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti; 2017.

Prema podacima SZO i CDC-a u Hrvatskoj je 2015. godine otpornost *K. pneumoniae* na karbapeneme iznosila od 1 do 5%, a 2021. godine taj broj je porastao na 25 do 50% (Slika 1, Slika 2).



**Slika 2.** Postotak otpornosti *K. pneumoniae* na karbapeneme u Europskim državama, 2021. Preuzeto i prilagođeno uz dopuštenje SZO iz: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti i Svjetska Zdravstvena Organizacija; 2023.

U Hrvatskoj je otkriven niz karbapenemaza uključujući karbapenemaze klasa A (KPC), B (VIM, NDM) i D (OXA) (32-35). Na sjeverozapadnom području Hrvatske proširio se ST258 klon *K. pneumoniae* koja proizvodi KPC karbapenemazu dok se na jugu proširio klon ST101 koji je povezan sa nepovoljnim terapijskim ishodima posebice u pacijenata na jedinici intenzivnog liječenja (35, 36). Sojevi *K. pneumoniae* koji proizvode OXA-48 izolirani su iz bolničkih centara diljem Hrvatske uključujući i u Splitu, ali počeli su se javljati i u manjim bolnicama (34). U Kliničkom bolničkom centru u Splitu (KBC Split) su otkriveni sojevi *K. pneumoniae* koji su, osim otpornosti na karbapeneme, razvili otpornost na kolistin koji je jedan od antibiotika koji se koristi za liječenje bakterija otpornih na karbapeneme (36). Također je provedena studija koja je uzorkovala i analizirala otpadne vode područja Splita i okolice koje se ispuštaju u Brački i Splitski kanal. Izolirano je petnaest izolata enterobakterija od kojih je devet pripadalo *E. coli* i četiri *K. pneumoniae*. Svi osim jednog izolata su bili otporni na barem jedan karbapenem i proizvodili su KPC enzim. Genskom analizom izolata *E. coli* i *K. pneumoniae* na plazmidima su otkriveni geni za KPC-2 i OXA-48 karbapenemaze (37).

### 1.4.2 *E. coli*

Europa bilježi porast otpornosti *E. coli* na cefalosporine treće generacije još od 2002. godine. Smanjena potrošnja cefalosporina u prošlom desetljeću je usporila trend porasta otpornosti (38). Sojevi *E. coli* otporni na karbapeneme su rijetki, ali pojava sojeva koji proizvode beta laktamazu OXA-244 može pridonijeti većoj otpornosti na karbapeneme ukoliko se ti sojevi prošire po Europi (5).

Najraniji podatci Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj o otpornosti *E. coli* su iz 2008. godine. Tada je otpornost *E. coli* iznosila 3% za sva četiri testirana cefalosporina treće generacije: ceftazidim, ceftriakson, cefiksim i ceftibuten (39). Do 2015. godine ta se otpornost povećala na 6% za ceftazidim, 7% za ceftriakson, 8% za cefiksim i 4% za ceftibuten (30). U 2022. godini otpornost na cefalosporine treće generacije iznosila je od 9% do 10% (9% za ceftazidim i ceftriakson, 10% za cefiksim) (31). Otpornost *E. coli* na karbapeneme u 2022. godini je manja od 1% dok je otpornost na ciprofloksacin 18%, a otpornost na trimetoprim-sulfametaksazol 26%. Zbog male stope otpornosti, lijekovi izbora za liječenje nekompliciranih infekcija mokraćnog sustava (IMS) su nitrofurantoin (otpornost 3%), fosfomicin (otpornost 1%) i nitroksolin (otpornost manja od 1%) (31). U Hrvatskoj je 2018. godine opisan prvi slučaj *E. coli* koja proizvodi OXA-48 karbapenemazu, a gen za tu karbapenemazu je dobila od *K. pneumoniae* (40). Ispitivanjem sojeva izoliranih iz kliničkih centara u Hrvatskoj, dokazana je sposobnost prenošenja gena za KPC karbapenemazu sa sojeva *K. pneumoniae* na sojeve *E. coli* (33).

Obzirom na sve navedeno od iznimne je važnosti istraživati nove terapijske opcije. Jedna od mogućnosti leži u istraživanju starih antibiotika koji desetljećima nisu bili u širokoj uporabi zbog čega se nije razvila otpornost na njih (41, 42). Među ovim antibioticima nalazi se i nitroksolin (42). Dosada su provedena istraživanja o učinkovitosti nitroksolina na sojevima prikupljenim iz ambulantnih bolesnika, ali u nedovoljnom broju. Posebice postoji manjak istraživanja usmjerenih na nekomplicirane IMS u ambulantnih bolesnika uzrokovanih *E. coli* koje stvaraju ESBL i *K. pneumoniae* koje stvaraju karbapenemaze (42). U Hrvatskoj je provedeno istraživanje o osjetljivosti *E. coli* na nitroksolin (43), ali prema našim saznanjima u Hrvatskoj dosada nije provedeno istraživanje o antimikrobnoj učinkovitosti nitroksolina na sojevima *K. pneumoniae* koje proizvode karbapenemaze.

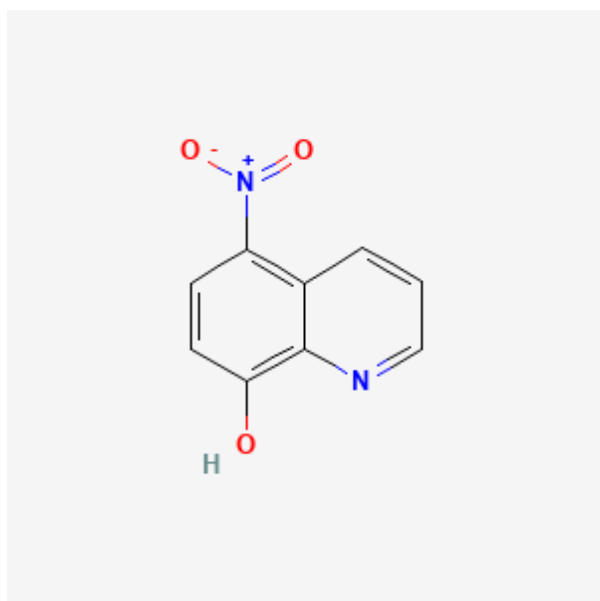
### 1.5 Nitroksolin

Nitroksolin je stari antibiotik koji je prvi put opisan sredinom prošlog stoljeća, a primjenjuje se od 1962. godine u liječenju IMS uzrokovanih *E. coli* (42-44). Zbog tadašnjeg

slabog poznavanja njegovih farmakokinetičkih i farmakodinamskih svojstava, mehanizma aktivnosti te spektra djelovanja, bilo je teško odrediti pravilnu primjenu nitroksolina koja bi osigurala zadovoljavajući terapijski učinak. Zbog toga je njegova šira primjena napuštena, dok se nastavio primjenjivati kao lijek protiv *E. coli* u istočnoj Europi i određenim gradovima u Njemačkoj (42).

### 1.5.1 Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja nije u potpunosti objašnjen, ali smatra se da antimikrobnu aktivnost ostvaruje kelacijom divalentnih kationa koji su potrebni za pravilan rad metaloenzima (45). Uočeno je da analog nitroksolina (8-hidroksikinolin) inhibira RNA polimerazu kvasnica i bakterija kelacijom iona mangana i magnezija. Time ih uklanja iz okolnog okruženja i ometa funkciju polimeraze (46). Cherdtrakulkiat i surdanici testirali su *in vitro* antimikrobnu aktivnost 8-hidroksikinolina i nitroksolina uz dodatak različitih koncentracija iona. Dokazali su da povećana prisutnost iona mangana, cinka, bakra i željeza ometa funkciju 8-hidroksikinolina. Ipak, uočili su da se *in vitro* aktivnost nitroksolina ne smanjuje dodatkom iona mangana i magnezija, ali se smanjuje dodatkom iona bakra i željeza (47).



**Slika 3.** Kemijska struktura nitroksolina. Pruzeto sa stranice PubChem [preuzeto 18. lipnja 2024.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitroxoline>

Nitroksolin svoju učinkovitost u infekcijama mokraćnog sustava ostvaruje i inhibicijom adhezija bakterija za uroepitel i urinarne katetere (45, 48, 49).

Budući da su divalentni kationi željeza i cinka važni u stvaranju i održavanju biofilma, nitroksolin pokazuje aktivnost razgradnje biofilma kelacijom kationa. Dokazano je da reducira



održivost biofilma koji stvaraju *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Acinetobacter baumannii* (49-51).

### 1.5.2 Farmakokinetika i farmakodinamika

Primjena nitroksolina dostupna je jedino u oralnom obliku zbog čega je pogodan za liječenje ambulantnih bolesnika (52, 53). Apsorbirani lijek se brzo metabolizira u jetri u konjugirani oblik koji se izlučuje bubrezima u urin. Manji dio (oko 1 posto) izlučuje se putem urina u nekonjugiranom obliku (53).

Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (*engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) definirao je prijelomnu točku od 16 mg/L kao minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) za osjetljivost *E. coli* u liječenju nekomplikiranih infekcija mokraćnog sustava (54) što znači da se izolati *E. coli* kojima je utvrđen MIK manji ili jednak 16mg/L smatraju osjetljivim na nitroksolin. Ova koncentracija postiže se u urinu nakon primjene jedne kapsule nitroksolina od 250 mg (55). *In vivo* studije potvrdile su učinkovitost nitroksolina u liječenju nekomplikiranih infekcija mokraćnog sustava (55, 56), ali prijavljen je terapijski neuspjeh u gerijatrijskoj populaciji (57). Izgleda da antimikrobna učinkovitost nitroksolina ovisi o pH vrijednosti urina pri čemu pokazuje pojačanu aktivnost pri nižim pH vrijednostima (45, 55).

### 1.5.3 Antifungalna, antiviralna i antiparazitarna aktivnost

Nitroksolin se pokazao kao obećavajući antifungik za liječenje kandidurije budući da pokazuje dobru *in vitro* aktivnost protiv *Candida* spp., a posebice *Candida auris*. Imao je niže minimalne inhibitorne koncentracije od flukonazola koji je najčešći primjenjivani lijek u terapiji kandidurije. Osim toga, učinkovitost nitroksolina bila je visoka i protiv sojeva koji su otporni na azole (58).

Kao potencijalni antivirusni lijek, inhibirao je replikaciju virusa majmunskih boginja (59) i virusa japanskog encefalitisa (60). Također, nitroksolin je pokazao antimikrobnu aktivnost protiv bakterija koje često prate infekciju mpox virusom zbog čega može biti koristan u sprječavanju bakterijskih superinfekcija (59).

Dokazana je i učinkovitost protiv amebe *Balamuthia mandrillaris*. To je ameba koja uzrokuje smrtonosnu infekciju središnjeg živčanog sustava. Nitroksolin se pokazao kao snažan i učinkovit lijek protiv amebe inhibicijom trofozoita u *in vitro* uvjetima (61). Opisan je slučaj u Kaliforniji 2023. godine u kojem je uvođenjem nitroksolina u terapijski režim uočeno smanjenje moždanih lezija nakon tjedan dana od početka primjene (62).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## 2.1 Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je ispitati antimikrobnu aktivnost nitroksolina prema sojevima *E. coli* koje stvaraju ESBL i prema sojevima *K. pneumoniae* koje stvaraju ESBL i karbapenemaze, a koji su izolirani iz uzoraka urina ambulantnih bolesnika u Splitsko-dalmatinskoj županiji.

## 2.2 Hipoteze

1. Nitroksolin pokazuje dobru *in vitro* učinkovitost prema ESBL sojevima *E. coli*;
2. Nitroksolin pokazuje dobru *in vitro* učinkovitost prema ESBL sojevima *K. pneumoniae* i prema sojevima *K. pneumoniae* koji stvaraju karbapenemaze.

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

U ovom istraživanju su prikupljeni bakterijski izolati ESBL *E. coli* i sojevi *K. pneumoniae* koji stvaraju ESBL ili karbapenemaze, odnosno pokazuju otpornost na tri ili više skupina antibiotika. Izolati su prikupljeni od 1.11.2023. godine do 1.5.2024. godine na Odjelu za dijagnostiku infekcija urinarnog sustava Službe za kliničku mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije (NZJZ SDŽ) i pohranjeni na duboki agar.

Svi izolati su izolirani standardnim postupkom izolacije iz uzoraka urina ambulantnih bolesnika. Pri tome je iz uzoraka prvog jutarnjeg urina, uzetog tehnikom srednjeg mlaza nakon toaleta spolovila bolesnika, mikrokaliبرانom ezom nasijano 10 mikrolitara ( $\mu\text{L}$ ) urina na selektivnu bakterijsku podlogu UTI agar (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) i inkubirano na  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 sata. Kolonije koje su morfoloijom odgovarale *E. coli* (roze na UTI agaru) odnosno *K. pneumoniae* (plave na UTI agaru) su identificirane biokemijskim nizom (63). Potom je za svaki izolat rađeno testiranje osjetljivosti metodom disk difuzije po Kirby-Baueru.

Rad je odobren odlukom Etičkog povjerenstva NZJZ SDŽ.

### **3.1. Disk-difuzija (Kirby-Bauer metoda)**

Disk-difuzija je jedna od najčešće primjenjivanih metoda u testiranju antimikrobne osjetljivosti. Prikladna je za testiranje većine patogenih bakterija. Za izvođenje testa potrebno je pripremiti inokulum bakterijskog izolata koji želimo testirati. Sterilnom ezom ili brisom dotaknemo vrh kolonija izolata kojeg želimo testirati i pomiješamo ih u epruveti koja sadrži sterilnu fiziološku otopinu. Gustoću dobivene suspenzije prilagodimo na 0,5 McFarlanda fotometrijskom metodom. Suspenziju bi trebalo iskoristiti unutar sat vremena, ali idealno unutar petnaest minuta. Sterilni bris se uroni u suspenziju i, u slučaju gram negativnih bakterija, ocijedi pritiskom na stijenku epruvete. Suspenziju nanesimo ravnomjerno preko površine Mueller Hinton agara (MHA) koji je prethodno bio petnaest minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se, unutar petnaest minuta, na površinu podloge nanose diskovi natopljeni antimikrobnim tvarima koji su prethodno ugrijani na sobnu temperaturu. Antimikrobne tvari brzo difundiraju iz diskova u podlogu. Unutar petnaest minuta podloge bi trebalo okrenuti i inkubirati na  $37^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 sata u aerobnim uvjetima. Antimikrobna tvar koja je difundirala u podlogu, ukoliko je djelotvorna, će inhibirati rast bakterija. Porast bakterija bit će vidljiv na udaljenosti od diska u koju je difundirala premala koncentracija antimikrobne tvari. Izostanak rasta oko diska zove se zona inhibicije.

Da bi odredili osjetljivost izolata izmjerimo promjer zone inhibicije izražen u milimetrima. Ovisno o izmjerenoj veličini zone inhibicije interpretiraju se kategorije osjetljivosti prema EUCAST kriterijima. Kategorije osjetljivosti su: osjetljiv (S), umjereno osjetljiv (I) ili otporan (R) soj. Potrebno je koristiti standardizirani soj kao kontrolu kvalitete. Standardizirani sojevi za kontrolu su komercijalno dostupni (64).

### 3.1.1 ESBL test

Metoda dvostrukog diska koristi se za utvrđivanje stvaranja ESBL. Test se izvodi koristeći dva diska cefalosporina bez prisutnosti klavulanske kiseline između kojih se postavlja amoksisilin s klavulanskom kiselinom kao inhibitorom beta laktamaza. Institut za kliničke i laboratorijske standarde (*engl. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI*) preporuča da se test izvodi na MHA (65). U slučaju da testirani soj stvara ESBL uočiti će se sinergizam između diska cefalosporina i amoksicilina u kombinaciji sa klavulanskom kiselinom. Očituje se kao povećanje zone inhibicije između cefalosporina i amoksicilina s klavulanskom kiselinom, u obliku tzv. „zone duha“ (66, 67).

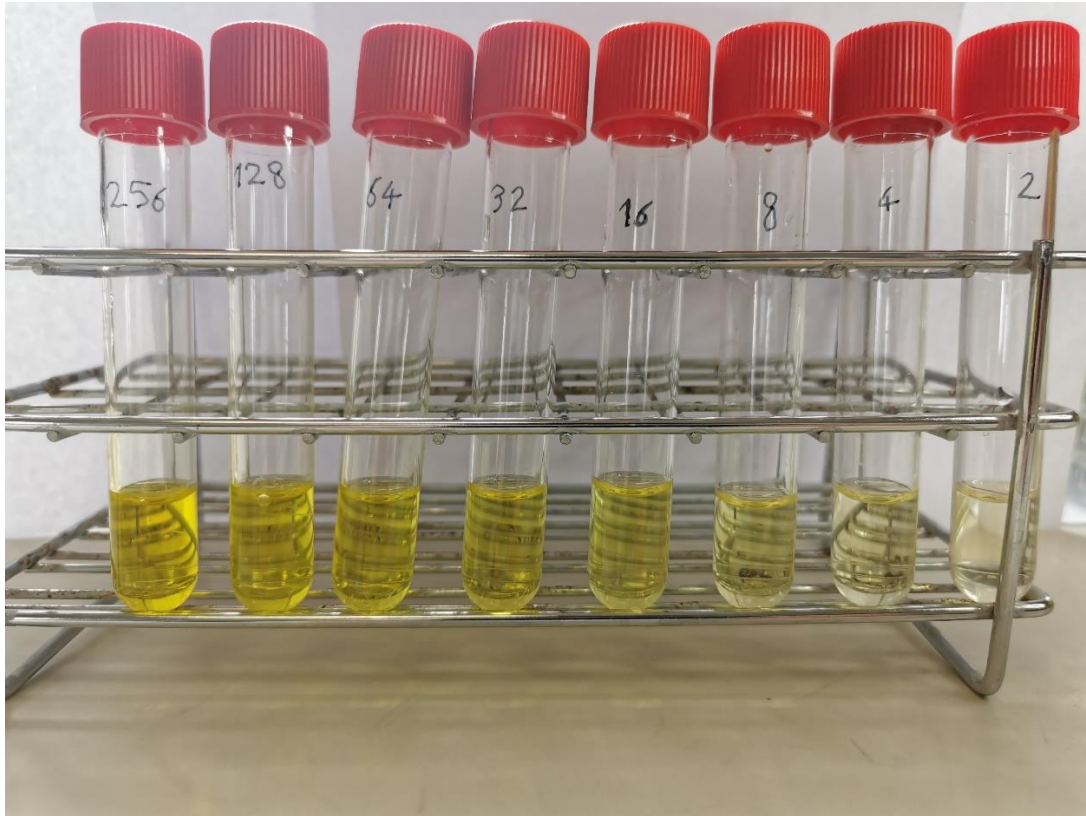
### 3.1.2 Detekcija karbapenemaza

Coris Resist-5 O.K.N.V.I je komercijalni imunokromatografski test lateralnog toka koji služi za detekciju karbapenemaza enterobakterija. Pogodan je za brzu detekciju OXA-48, KPC, NDM, VIM i IMP karbapenemaza. Za izvođenje testa prvo je potrebno ukapati dvanaest kapi priloženog pufera u epruvetu. Zatim se sterilnom ezom pokupi jedna kolonija soja kojeg želimo testirati sa hranjive ploče i uroni u epruvetu. Sadržaj epruvete se prvo promiješa ezom, a zatim se zatvori priloženom kapaljkom i izmiješa na vorteksu. Nakon toga potrebno je ukapati 3 kapi uzorka u jastučić za uzorak. Rezultati testa očitavaju se 15 minuta od ukapavanja uzorka. Ako je na testnoj traci prisutna samo jedna crvenkasta linija pored slova C koje označava mjesto kontrolne linije, test se očitava kao negativan. Ako je prisutna crvena linija pored slova C i pored nekog drugog slova (O, K, N, V i I) koje označava testnu liniju za karbapenemaze, test se očitava kao pozitivan. U slučaju da je crvena linija prisutna pored slova O, soj proizvodi OXA-48 karbapenemazu, pored slova K soj proizvodi KPC, pored slova N soj proizvodi NDM, pored slova V soj proizvodi VIM, a pored slova I soj proizvodi IMP karbapenemazu. Moguće je više pozitivnih testnih linija u slučaju da soj proizvodi više različitih karbapenemaza. Neispravni test se prepoznaje po tome da izostaje crvenkasta linija pored slova C (68).

Budući da testiranje osjetljivosti izolata *K. pneumoniae* na nitroksolin nije opisano u EUCAST smjernicama, za to testiranje smo se koristili uputama za metodu mikrodilucije u bujonu koja je opisana u CLSI smjernicama te u radu Cherdtrakulkiat i suradnika (47, 69).

### 3.2 Metoda mikrodilucije u bujonu

Za testiranje antibiotske osjetljivosti sojeva enterobakterija, izuzev *E. coli* čiju smo osjetljivost testirali disk difuzijskom metodom, koristili smo metodu koja se naziva „mikrodilucijom“ jer koristi male volumene bujona s antibiotikom stavljenih u sterilne, plastične mikrotitarske pločice koje sadrže jažice sa okruglim ili stožastim dnom.



**Slika 4.** Priprema razrjeđenja antimikrobne tvari. Slikano u mikrobiološkom laboratoriju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije.

#### 3.2.1 Priprema i skladištenje razrijeđene antimikrobne tvari

Za pripremu mikrotitarske pločice pripremili smo volumetrijska razrjeđenja antimikrobne tvari (nitroksolina) u Mueller Hinton bujonu (MHB) koje smo dobili metodom dvostrukog razrjeđenja temeljne otopine početne koncentracije 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sa Mueller Hinton bujonom (MHB) (Slika 3). Temeljnu otopinu dobili smo otapanjem nitroksolina u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pri tome smo u nizu epruveta miješali 3 mL MHB sa 3 mL otopine antibiotika idući od viših prema nižim koncentracijama (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Slika 3). Pri tom smo koristili jednu pipetu za mjerenje svih otapala i za dodavanje temeljne antimikrobne otopine u prvu epruvetu, a zatim novi nastavak za pipetu u svakom idućem koraku procesa razrjeđenja (69).

Iz epruveta smo u svaku jažicu na mikrotitarskoj ploči stavili 50  $\mu\text{L}$  otopine nitroksolina koncentracija u rasponu od 2 – 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koje smo dobili metodom dvostrukog razrjeđenja sa MHB. Svaka pločica je sadržavala i jažicu za kontrolu rasta pripremljenu dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  same bakterijske suspenzije (pozitivna kontrola) te jednu jažicu u koju je dodan samo MHB (negativna kontrola) (47).

Napunjene pločice smo zatvorili poklopcem i odmah smjestili u zamrzivač na  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  dok ne budu potrebne. Odmrznute antimikrobne otopine ne smiju se ponovno zamrznuti jer opetovano zamrzavanje i odmrzavanje ubrzaje degradaciju nekih antimikrobnih tvari (69).

### **3.2.2 Priprema inokuluma i inokulacija**

Metoda izravne suspenzije kolonije je najpogodnija metoda za pripremu inokuluma. Može se koristiti za većinu mikroorganizama (69). Pripremili smo inokulum izradom suspenzije u 5 mL MHB sa izoliranim kolonijama koje su odabrane sa neselektivne podloge krvni agar (KA) nakon 18 do 24-satne inkubacije na  $37^{\circ}\text{C}$  i prilagodili gustoću suspenzije ekvivalentnu standardu od 0,5 McFarlanda pri čemu smo koristili fotometrijski uređaj.

U svaku jažicu s prethodno pripremljenim razrjeđenjima antibiotika smo dodali 50  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije ispitivanih bakterijskih sojeva MDR enterobakterija gustoće 0,5 McFarlanda ( $1,5 \times 10^8$ ) (47).

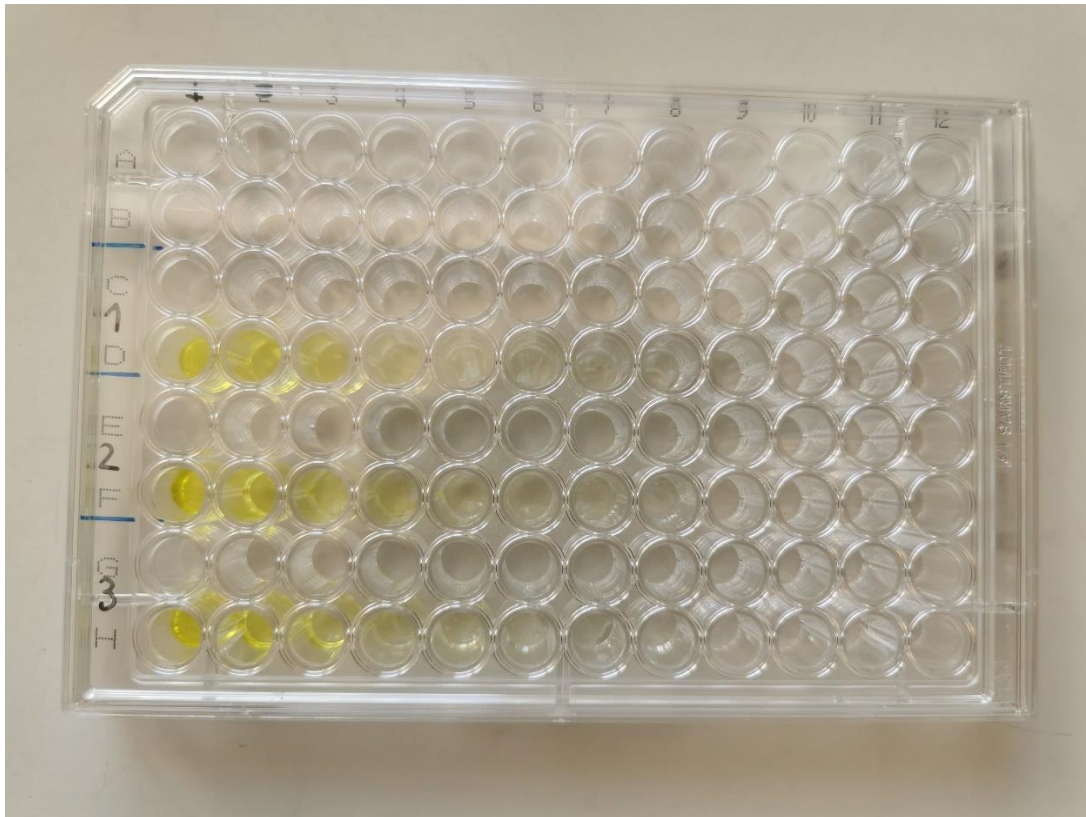
### **3.2.3 Inkubacija**

Inokulirane mikrotitarske pločice su inkubirane na  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  tijekom 16 do 20 sati u inkubatoru u aerobnim uvjetima unutar 15 minuta od dodavanja inokuluma. Da bismo održali sve kulture na istoj temperaturi, slagali smo najviše četiri pločice jednu na drugoj. Da bismo spriječili sušenje, prije inkubacije smo zatvorili svaku pločicu plastičnim poklopcem.

### **3.2.4 Određivanje krajnjih točaka minimalne inhibitorne koncentracije**

Usporedili smo količinu rasta u jažicama koje sadrže antimikrobnu tvar sa količinom rasta u jažicama koje služe za kontrolu rasta na svakoj mikrotitarskoj pločici (pozitivna kontrola). Da bi se test smatrao važećim, prihvatljivi rast ( $\geq 2$  mm taloga ili definitivno замуćenje) se morao vidjeti i u jažicama za kontrolu rasta. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je određena kao najmanja koncentracija testirane tvari koja je inhibirala vidljivi rast bakterija (69).





**Slika 5.** Mikrotitarska pločica s antibiotskim razrjeđenjima nitroksolina i inokuliranim bakterijskim sojevima. Slikano u mikrobiološkom laboratoriju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije.

U slučaju da se pojavila jedna preskočna jažica u mikrodilucijskom testu, očitali smo najviši dobiveni MIK. Ako bi se za određeni soj pojavilo više od jedne preskočne jažice, ponavljali smo testiranje za taj bakterijski soj.

### 3.2.5 Mueller Hinton bujon

Za testiranje osjetljivosti često izoliranih i brzorastućih aerobnih ili fakultativnih organizama preporuča se koristiti MHB zato što:

1. Pokazuje prihvatljivu reproducibilnost između serija za testiranje osjetljivosti;
2. Sadrži malo inhibitora koji utječu na rezultate testiranja osjetljivosti na sulfonamide, trimetoprim i tetraciklin;
3. Podržava zadovoljavajući rast većine patogena;
4. Prikupljena je velika količina podataka i iskustava o testovima koji su koristili ovaj medij (69).

Za kontrolu kvalitete je korišten ATTC soj *E. coli*. Za svaku seriju MHB provjerena je pH vrijednost te je urađena kontrola kvalitete korištenjem ATTC soja *E. coli*.

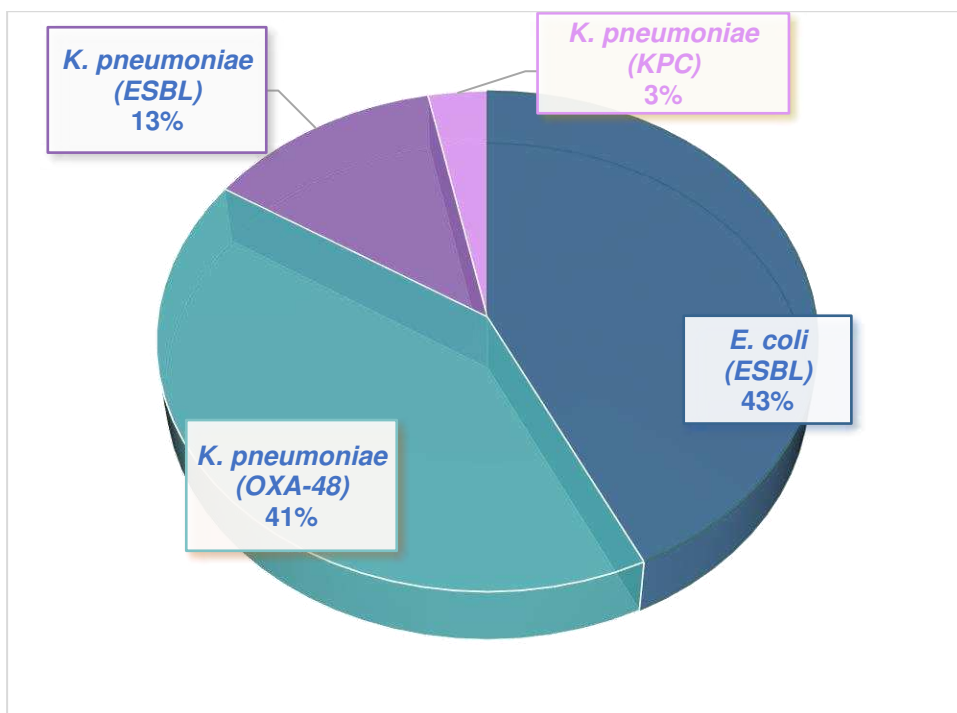
### **3.3. Statističke metode**

U radu su korištene metode opisne i inferencijalne statistike. Statistički značajnom se smatrala razlika manja od 0,05. Za izračune su korišteni računalni program CalculatorSoup (Furey Edward, SAD. Dostupno na: <https://www.calculatorsoup.com/>), program Microsoft Excel (Microsoft Corporation, SAD. Dostupno na: <https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel>) i VassarStats (Richard Lowry, SAD. Dostupno na: <http://www.vassarstats.net/>).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1 Obilježja prikupljenih sojeva

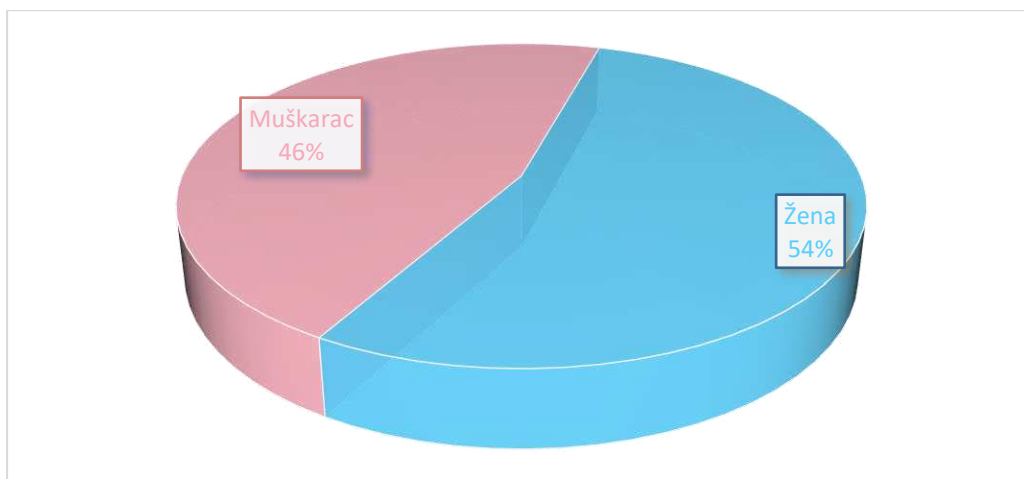
U razdoblju od 1.11.2023. godine do 1.5.2024. godine prikupljena su sveukupno 63 soja višestruko otpornih enterobakterija iz uzoraka urina ambulantnih bolesnika na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, a svi bolesnici su imali prebivalište u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Od ukupnog broja prikupljenih sojeva, izolirano je 27 (43%) izolata *E. coli* od kojih svi produciraju ESBL, 26 (41%) izolata *K. pneumoniae* koje produciraju OXA-48 karbapenemazu, 8 (13%) izolata *K. pneumoniae* koje produciraju ESBL te 2 (3%) izolata *K. pneumoniae* koje produciraju KPC karbapenemazu (Slika 6.).



**Slika 6.** Raspodjela izoliranih višestruko otpornih enterobakterija

#### 4.2 Demografska obilježja ambulantnih bolesnika

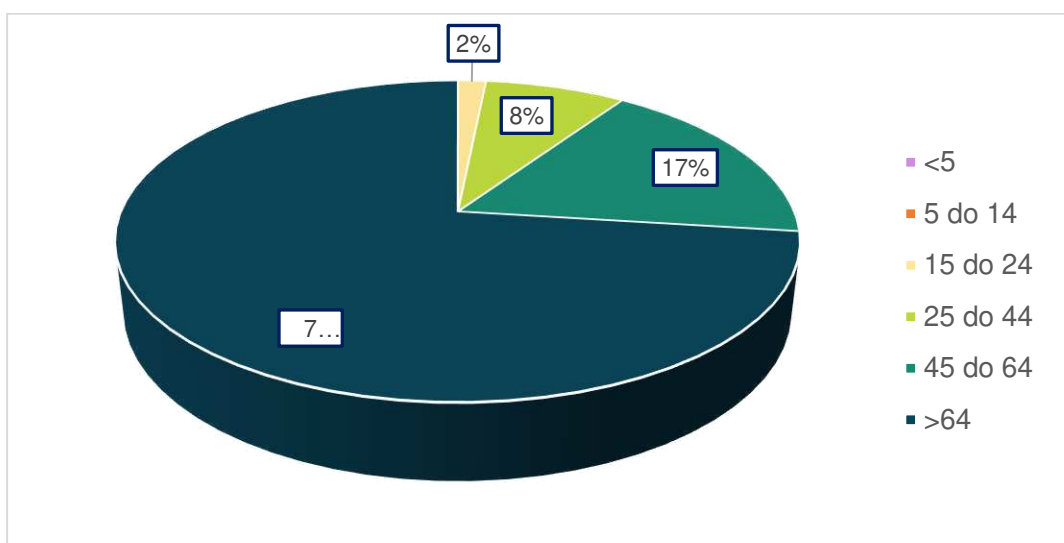
Analizom demografskih obilježja ambulantnih bolesnika iz čijih su uzoraka urina izolirane višestruko otporne enterobakterije u NZJZ SDŽ, ustanovljeno je da su 29 (46%) izolata višestruko otpornih enterobakterija izolirana u muškaraca, a 34 (54%) u žena (Slika 7.). Nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli bolesnika prema spolu ( $\chi^2 = 0,79$ ;  $P > 0,05$ ).



**Slika 7.** Raspodjela bolesnika prema spolu

Najmlađa dob bolesnika je iznosila 19 godina, dok je najstarija dob bolesnika bila 97 godina što nam daje raspon godina u iznosu od 78. Medijan dobi iznosio je 76 uz interkvartilni raspon (IQR) od 19, tj. 64-83.

Na slici 8. prikazana je dobna raspodjela ambulantnih bolesnika iz čijih uzoraka urina su izolirane višestruko otporne enterobakterije. Analizom je utvrđeno da je najveći broj izolata izoliran iz uzoraka bolesnika dobne skupine iznad 65 godina, njih 46, što predstavlja 73% sveukupnih izolata, a zatim iz dobne skupine od 45 do 64 godina, njih 11, što predstavlja 17% sveukupnih izolata. Slijedi dobna skupina od 25 do 44 godina sa izoliranih 5 izolata što predstavlja 8% sveukupnih izolata, a samo jedan izolat izoliran je iz dobne skupine od 15 do 24 godina. Broj bolesnika starijih od 65 godina bio je statistički značajno veći od broja bolesnika u svim ostalim dobnim skupinama zajedno ( $\chi^2 = 26,7$ ;  $P < 0,05$ ).



**Slika 8.** Raspodjela bolesnika prema dobi

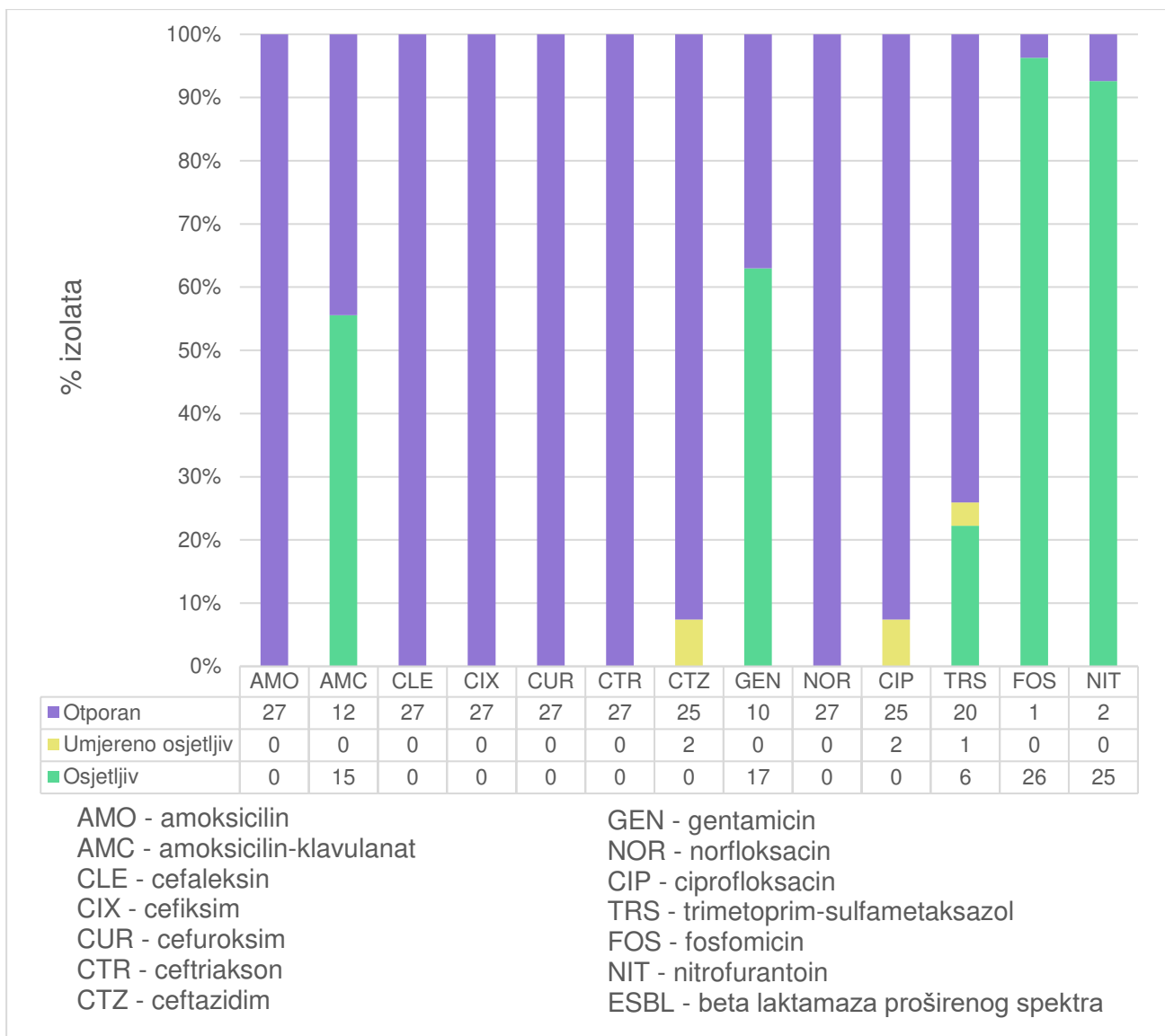
### 4.3 Otpornost izolata na antibiotike

Metodom disk difuzije rutinski je testirana osjetljivost prikupljenih sojeva u dijagnostičke i terapijske svrhe. U sljedećim odjeljcima izrazit ćemo rezultate osjetljivosti prikupljenih sojeva na sljedeće antibiotike: amoksisilin (AMO), amoksisilin-klavulanat (AMC), cefaleksin (CLE), cefiksim (CIX), cefuroksim (CUR), ceftriakson (CTR), ceftazidim (CTZ), ceftazidim u kombinaciji s avibaktamom (CTV), ertapenem (ERT), imipenem (IMI), meropenem (MER), gentamicin (GEN), amikacin (AMI), norfloksacin (NOR), ciprofloksacin (CIP), trimetoprim-sulfametaksazol (TRS), fosfomicin (FOS), nitrofurantoin (NIT) i nitroksolin (NTX).

#### 4.3.1 *E. coli*

Metodom disk difuzije testirana je osjetljivost svih 27 prikupljenih sojeva ESBL *E. coli* na amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson, ceftazidim, gentamicin, norfloksacin, ciprofloksacin, trimetoprim-sulfametaksazol, fosfomicin i nitrofurantoin. Na slici 9. prikazana je osjetljivost izolata *E. coli* na navedene antibiotike. Analizom utvrđujemo da niti jedan izolat (0%) nije osjetljiv na amoksisilin, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson, ceftazidim, norfloksacin i ciprofloksacin, dok je 22,2% izolata osjetljivo na trimetoprim-sulfametaksazol. Malo više od polovice izolata je osjetljivo na amoksisilin-klavulanat (55,6%) dok je osjetljivost na gentamicin nešto viša (63%).

Izolati su u visokom postotku osjetljivi na fosfomicin i nitrofurantoin pri čemu je 26 (96,3%) izolata osjetljivo na fosfomicin, a 25 (92,6%) izolata osjetljivo na nitrofurantoin.

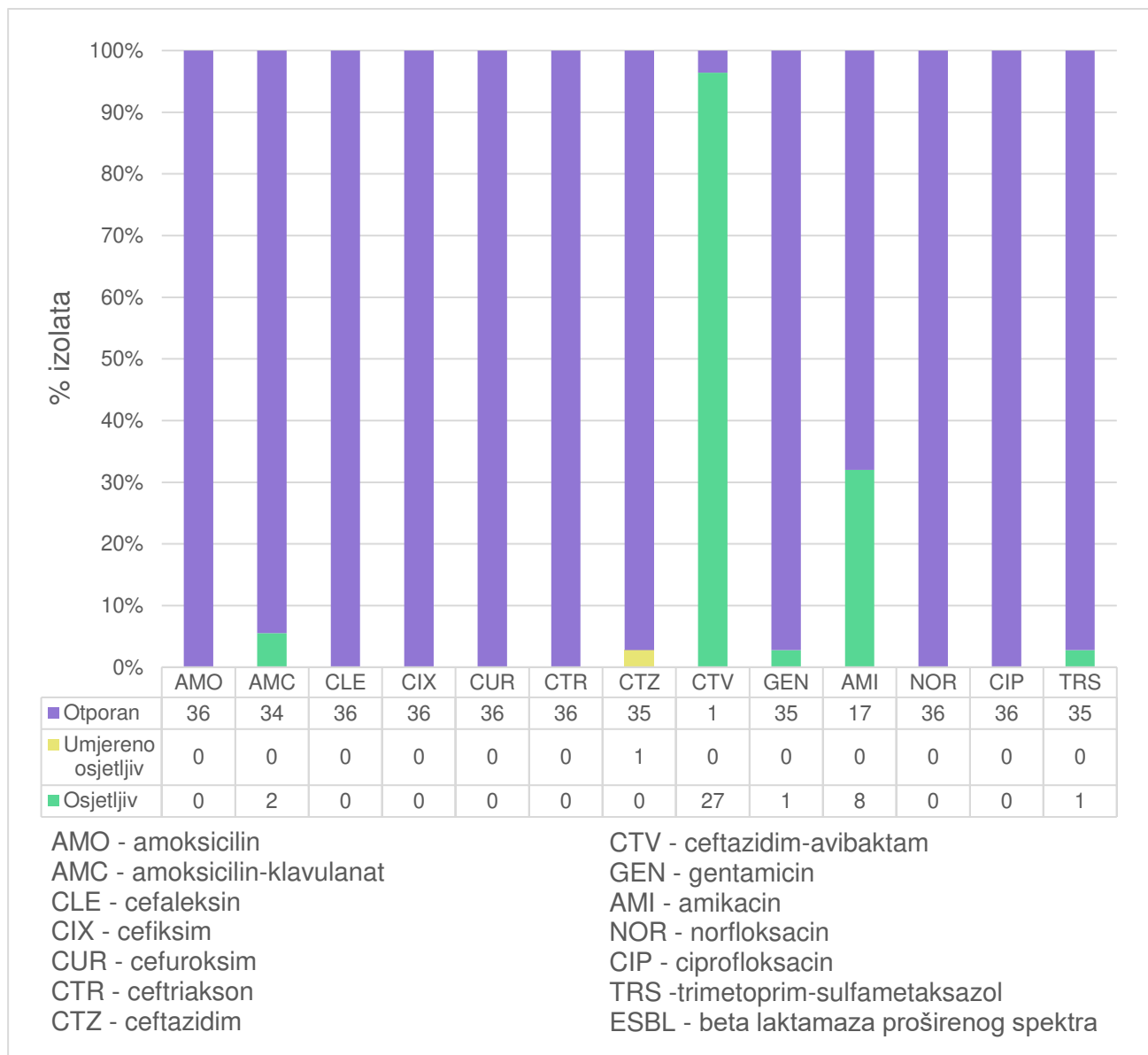


**Slika 9.** Osjetljivost izolata ESBL *E. coli* na antibiotike (n=27)

#### 4.3.2 *K. pneumoniae*

Osjetljivost svih 36 prikupljenih sojeva ESBL i karbapenemaza producirajućih *K. pneumoniae* testirana je disk difuzijskom metodom na amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson, ceftazidim, gentamicin, norfloksacin, ciprofloksacin i trimetoprim-sulfametaksazol. Osjetljivost 28 (77,8%) sojeva testirana je na ceftazidim-avibaktam, a osjetljivost 25 (69,4%) sojeva na amikacin. Na slici 10. prikazana je osjetljivost izolata *K. pneumoniae* na navedene antibiotike. Analizom utvrđujemo da niti jedan izolat (0%) nije osjetljiv na amoksisilin, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson, ceftazidim, norfloksacin i ciprofloksacin. Stopa osjetljivosti bila je iznimno niska za amoksisilin-klavulanat (5,6%), gentamicin (2,8%) i trimetoprim-sulfametaksazol (2,8%), a

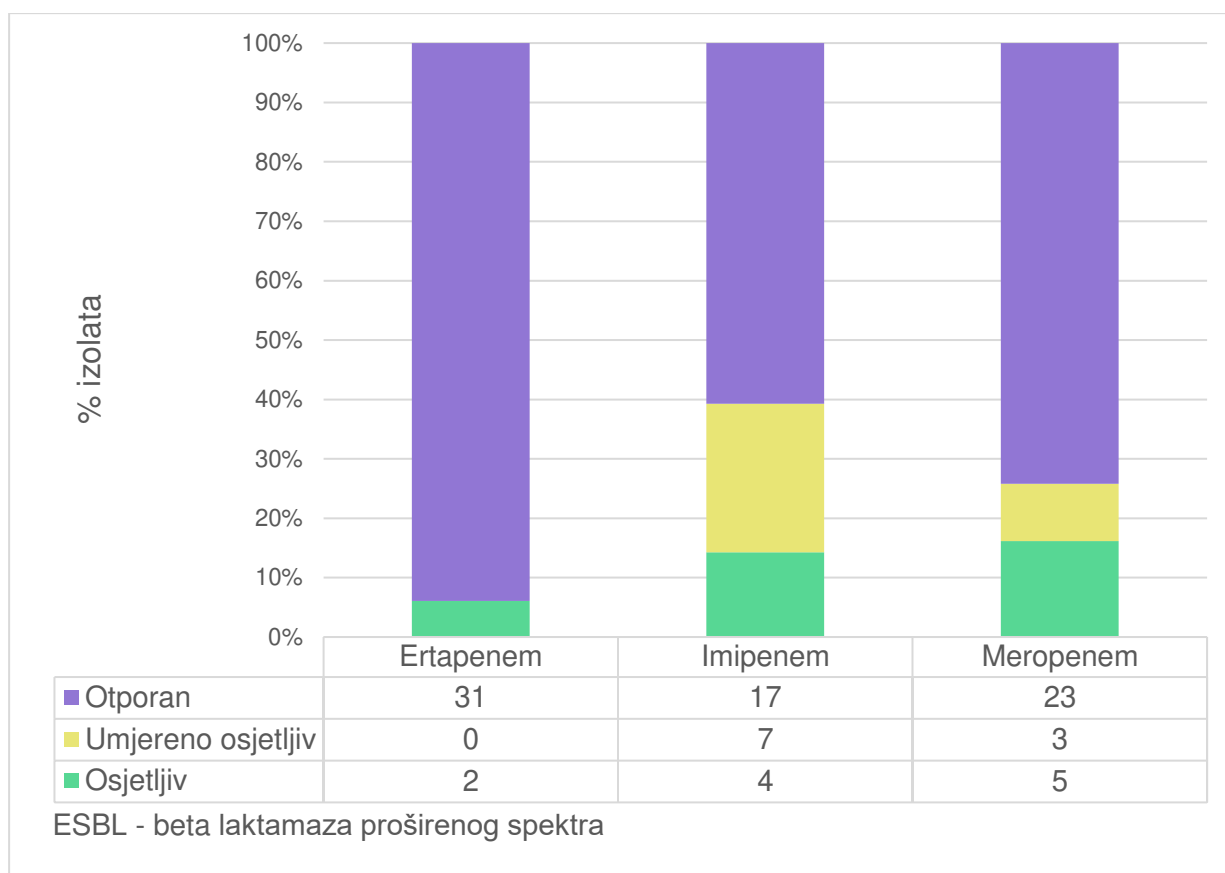
nešto viša za amikacin (32%). Osjetljivost na ceftazidim-avibaktam bila je visoka pri čemu je 27 (96,4%) izolata osjetljivo.



**Slika 10.** Osjetljivost izolata ESBL i karbapenemaza producirajućih *K. pneumoniae* na antibiotike.

Osjetljivost prikupljenih ESBL i karbapenemaza producirajućih sojeva *K. pneumoniae* testirana je i na karbapeneme, a rezultati osjetljivosti prikazani su na slici 11. Analizom utvrđujemo da je osjetljivost na karbapeneme niska. Sveukupno je 33 (91,7%) sojeva testirano na ertapenem pri čemu su 2 (6,1%) osjetljiva, 28 (77,8%) sojeva testirano je na imipenem pri čemu su 4 (14,3%) osjetljiva te je 31 (86,1%) soj testiran na meropenem pri čemu je 5 (16,1%) osjetljivih.



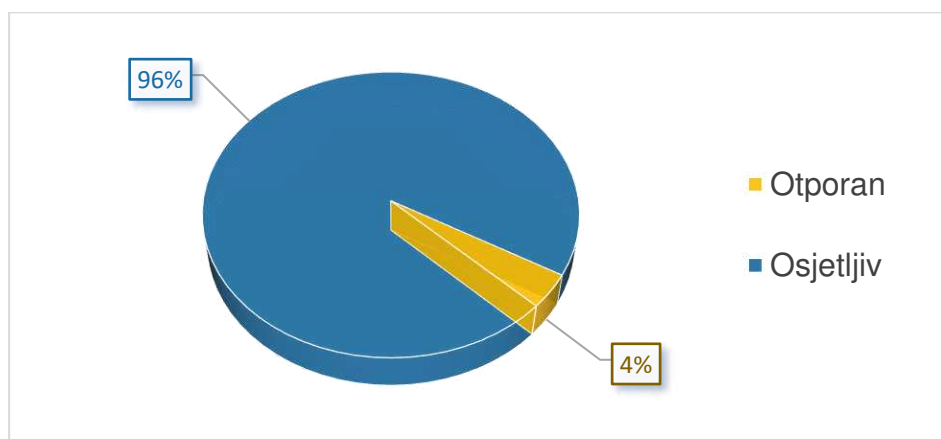


**Slika 11.** Osjetljivost izolata ESBL i karbapenemaza producirajućih *K. pneumoniae* na karbapeneme

#### 4.4 Rezultati antimikrobne aktivnosti nitroksolina

##### 4.4.1 *E. coli*

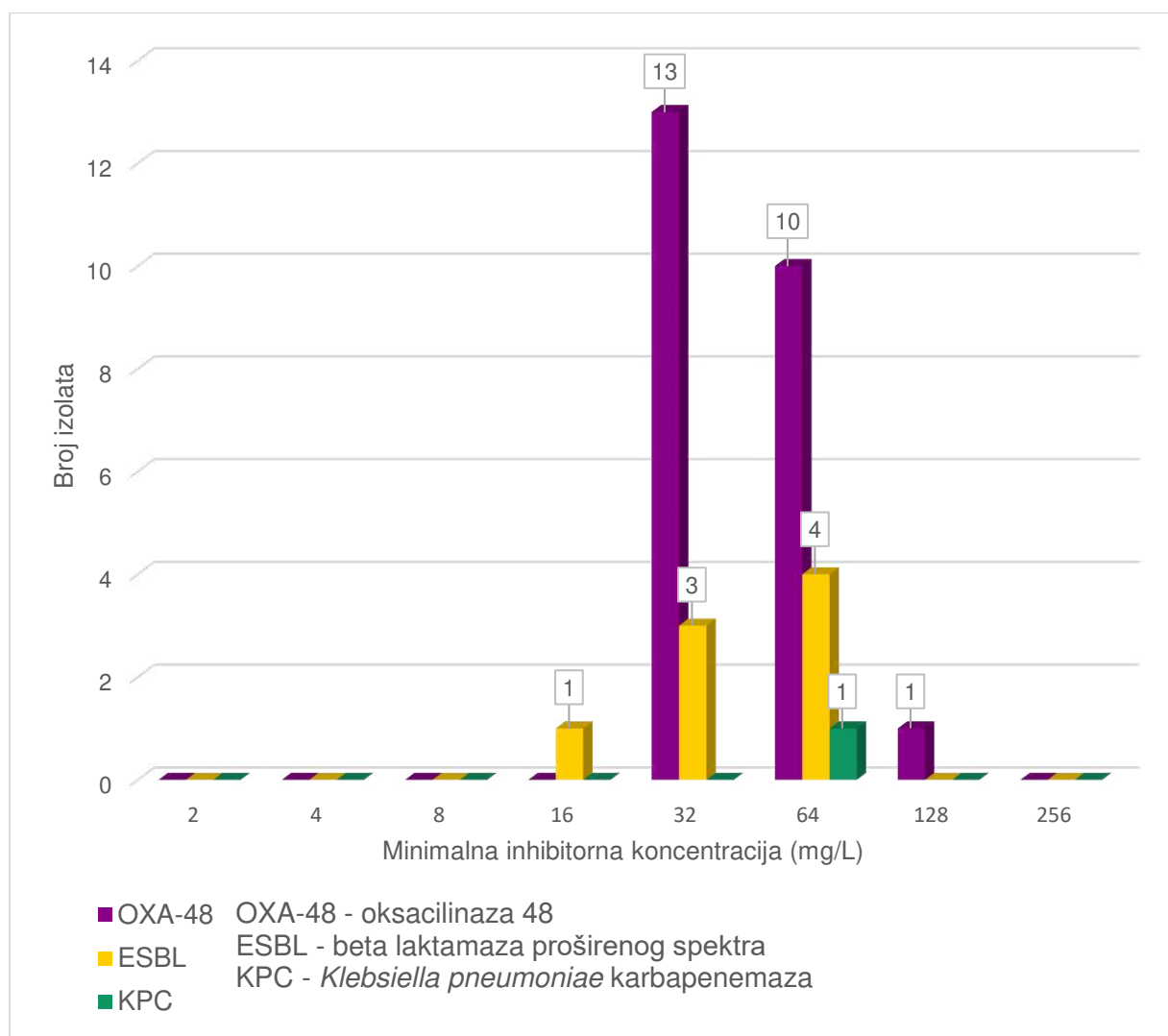
Metodom disk difuzije testirana je osjetljivost 26 (92,85%) sojeva ESBL *E. coli* na nitroksolin. Svi osim jednog testiranog izolata bili su osjetljivi na nitroksolin što nam daje visoku osjetljivost testiranih sojeva u iznosu od 96,2% (Slika 12.).



**Slika 12.** Osjetljivost izolata ESBL *E. coli* na nitroksolin (n=26)

#### 4.4.2 *K. pneumoniae*

Sveukupno su testirana 33 (91,7%) od 36 prikupljenih izolata budući da su 3 izolata (1 KPC i 2 OXA-38 producirajuća soja) imala neuspješnu subkultivaciju s dubokog agara čineći ih neupotrebljivim za testiranje aktivnosti nitroksolina. Preostala 33 soja su testirana na nitroksolin metodom mikrodilucije. Na slici 13. prikazani su rezultati očitanih vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije izražene u mg/L. Najniži MIK iznosio je 16 mg/L dok je najviši iznosio 128 mg/L što nam daje raspon od 112 mg/L. Medijan MIK-a iznosio je 32 mg/L, a prosječna vrijednost MIK-a iznosila je 48,97 mg/L ukazujući na visoke vrijednosti MIK-a.



**Slika 13.** Minimalna inhibitorna koncentracija nitroksolina prema izolatima *K. pneumoniae* podijeljenim prema beta laktamazama koje produciraju

## **5. RASPRAVA**

Antimikrobna otpornost postala je jedan od vodećih svjetskih javnozdravstvenih problema, a MDR enterobakterije igraju ključnu ulogu u njenom razvoju (4-6). Osim zdravstvenih, AMR ima i goleme financijske posljedice (8). Razvoj i otkriće novih terapijskih opcija jedno je od najjačih alata koje imamo u borbi protiv AMR zbog čega se pojavljuje sve veći interes za dodatno istraživanje i ponovno uvođenje starih antibiotika u kliničku praksu. Među tim antibioticima nalazi se i nitroksolin koji se upotrebljava za liječenje nekompliciranih IMS uzrokovanih *E. coli* (41, 42).

*E. coli* i *K. pneumoniae*, bakterije koje spadaju u porodicu enterobakterija, česti su uzročnici infekcija mokraćnog sustava od kojih je cistitis vodeća dijagnoza za propisivanje antibiotika u ambulantnih bolesnika (31). Njihova otpornost je u stalnom porastu uvelike zahvaljujući proizvodnji sve sofisticiranijih beta laktamaza koje razaraju beta laktamske antibiotike, a oni se ubrajaju među najčešće propisivane antibiotike (12, 20, 23).

Cilj ove studije bio je utvrditi antimikrobnu aktivnost nitroksolina prema MDR sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae*. Preciznije, aktivnost nitroksolina prema *E. coli* i *K. pneumoniae* koje produciraju ESBL te *K. pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze (OXA-48 i KPC). Nadalje, naša studija je istražila osjetljivost ovih sojeva prema ostalim antibioticima uključujući beta laktamske antibiotike te nitrofurantoin i fosfomicin kao terapijske izbore za nekomplicirane IMS (70).

Stopa osjetljivosti izolata *E. coli* na nitrofurantoin i fosfomicin je visoka te zajedno sa visokom stopom osjetljivosti izolata *K. pneumoniae* na ceftazidim-avibaktam u skladu je s izvješćem Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj iz 2022. godine (31). Visoka razina osjetljivosti je očekivana budući da su nitrofurantoin i fosfomicin antibiotici prve linije za liječenje nekompliciranih IMS (70).

Svi prikupljeni izolati *E. coli* otporni su na amoksicilin, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson i norfloksacin, a gotovo svi izolati su otporni na ceftazidim i ciprofloksacin. Slično tome, svi prikupljeni izolati *K. pneumoniae* otporni su na amoksicilin, cefaleksin, cefiksim, cefuroksim, ceftriakson, norfloksacin i ciprofloksacin, a gotovi svi izolati su otporni na amoksicilin-klavulanat, ceftazidim, gentamicin i trimetoprim-sulfametaksazol. Naši izolati također pokazuju visoku razinu otpornosti na karbapeneme što je očekivani rezultat budući da smo prikupili 28 izolata *K. pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze. Postotak otpornosti za sve antibiotike, osim za ceftazidim-avibaktam, nitrofurantoin i fosfomicin, je znatno veći od rezultata u izvješću Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u

Republici Hrvatskoj iz 2022. godine što je vjerojatno posljedica toga što smo mi testirali isključivo višestruko otporne bakterije (31). Studija provedena 2023. godine na sojevima *K. pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze izoliranih u KBC Split prijavljuje stope otpornosti sukladne našim (71).

Nitroksolin pokazuje odličnu aktivnost prema ispitivanim sojevima ESBL *E. coli* pri čemu je 96,2% testiranih izolata osjetljivo. Ovaj nalaz je u skladu s izvješćem Odbora za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj iz 2022. godine koji navodi iznimno nisku otpornost *E. coli* na nitroksolin u iznosu manjem od 1% (31). Studija Mareković i suradnika provedena na zagrebačkom području 2018. također ukazuje na dobru osjetljivost *E. coli* na nitroksolin, uključujući i ESBL sojeve (43). Ostale studije provedene na području Hrvatske na uzorcima MDR *E. coli* izoliranih iz ambulantnih bolesnika također ukazuju na vrlo visoku osjetljivost ESBL *E. coli* na nitroksolin (72, 73).

Njemačka studija provedena na 143 MDR *E. coli* izoliranih iz urina ambulantnih bolesnika utvrdila je stopostotnu aktivnost nitroksolina protiv svih testiranih izolata (74). Uzimajući u obzir izvrsnu aktivnost koju pokazuje u *in vitro* uvjetima, nitroksolin se predstavlja kao potencijalni lijek prvog izbora ili alternativa za liječenje nekompliciranih IMS uzrokovanih *E. coli*, uključujući i ESBL sojeve *E. coli*.

Metodom mikrodilucije testirana je aktivnost nitroksolina prema MDR *K. pneumoniae*. Dobivene vrijednosti MIK-a visoke su neovisno o tipu beta laktamaze koju producira soj. Raspon MIK-a iznosio je od 16 mg/L do 128 mg/L, medijan je iznosio 32 mg/L. Prema našim saznanjima ovaj tip istraživanja dosada nije proveden na području Republike Hrvatske. Naš rezultat nije u skladu sa sličnim studijama provedenim izvan Hrvatske na reprezentativnom uzorku MDR *K. pneumoniae*. Fuchs i Hamprecht su na uzorku od 46 *K. pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze dobili raspon MIK-a od 2 mg/L do 32 mg/L pri čemu je medijan bio znatno niži od našeg (75). Plambeck i suradnici su dobili znatno niže vrijednosti MIK-a za izolate koji produciraju karbapenemaze, ali testirani broj izolata je bio zamjetno manji od našeg (52).

Interpretacijske točke MIK-a za osjetljivost *K. pneumoniae* na nitroksolin još nisu definirane zbog čega ne možemo odrediti osjetljivost testiranih izolata. Budući da je prijelomna točka definirana samo za *E. coli* neke studije su je primjenjivale za predviđanje osjetljivosti ostalih izolata (75, 76). EUCAST je odredio MIK od 16 mg/L kao prijelomnu točku za *E. coli* pri čemu MIK jednak ili manji od prijelomne točke označava osjetljivi soj (54). Primjenjujući

tu prijelomnu točku naši sojevi su svi neosjetljivi s izuzetkom jednog izolata ESBL *K. pneumoniae*. Ova stopa osjetljivosti nije u skladu s drugim istraživanjima koji bi imali znatno veću stopu osjetljivosti budući da su dobili niže vrijednosti MIK-a. Mi ne možemo sa sigurnošću reći da su naši izolati *K. pneumoniae* većinom otporni na nitroksolin budući da interpretacijske točke nisu definirane, ali možemo to pretpostaviti na temelju dobivenih visokih vrijednosti MIK-ova. Prema tome nitroksolin se nije pokazao kao obećavajući lijek izbora za IMS uzrokovanih MDR *K. pneumoniae*. Dodatno, do sada je prijavljen terapijski neuspjeh nitroksolina u liječenju IMS u gerijatrijskoj populaciji (57) što je posebice značajno budući da je najveći broj naših izolata prikupljen iz uzoraka ambulantnih bolesnika iznad 65 godina. Visok broj otpornih izolata u starijoj dobi kakav je dobiven u ovom istraživanju je očekivan s obzirom da su broj hospitalizacija, infekcija i potrošnja antibiotika najviši u tim dobnim skupinama (31, 77).

Ograničenje ove studije je nemogućnost precizne interpretacije MIK-ova budući da nisu objavljeni kriteriji potrebni za očitavanje osjetljivosti *K. pneumoniae* na nitroksolin. Osim toga, za pouzdanije rezultate potrebno je istraživanje na većem broju uzoraka koji bi bili prikupljeni iz više centara diljem Hrvatske naspram našeg manjeg uzorka prikupljenog u jednom centru.

Zaključno, uzimajući u obzir izvrsnu aktivnost koju pokazuje u *in vitro* uvjetima, nitroksolin se pokazuje kao potencijalni lijek izbora za liječenje nekompliciranih IMS koje uzrokuje ESBL *E. coli*. Međutim, visoke vrijednosti MIK-ova ukazuju na nisku aktivnost nitroksolina prema testiranim izolatima MDR *K. pneumoniae*, odnosno nitroksolin se nije pokazao kao obećavajući lijek izbora za IMS uzrokovanih MDR *K. pneumoniae*.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Budući da izolati pokazuju visoku razinu osjetljivosti na nitroksolin, on se pokazuje kao potencijalni lijek izbora za liječenje nekompliciranih IMS koje uzrokuje ESBL *E. coli*.
2. Visoke vrijednosti MIK-ova ukazuju na nisku aktivnost nitroksolina prema testiranim izolatima MDR *K. pneumoniae*, odnosno nitroksolin se nije pokazao kao obećavajući lijek izbora za IMS uzrokovanih MDR *K. pneumoniae*.
3. Prikupljeni izolati MDR enterobakterija pokazuju nisku razinu osjetljivosti na gotovo sve antibiotike koji se rutinski testiraju u dijagnostičke i terapijske svrhe, uključujući cefalosporine treće generacije i kinolone.
4. Prikupljeni izolati *E. coli* pokazuju visoku razinu osjetljivosti na nitrofurantoin i fosfomicin što je u skladu s njihovim statusom kao antibioticima prve linije za liječenje nekompliciranih IMS.
5. Prikupljeni izolati *K. pneumoniae* pokazuju visoku razinu osjetljivosti isključivo na ceftazidim-avibaktam.



## **7. LITERATURA**

1. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* 2019;51:72–80.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Ženeva, Švicarska: World Health Organization; 2014.
3. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health.* 2015;109:309–18.
4. World Health Organization [Internet]. Ženeva, Švicarska: World Health Organization; 2023. Antimicrobial Resistance [citirano 21. lipnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
5. European Centre for Disease Prevention and Control, World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, World Health Organization; 2023.
6. Centers for Disease Prevention and Control. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta GA: Centers for Disease Prevention and Control; 2019.
7. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A i sur. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399:629–55.
8. World Bank. Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future. Washington DC: World Bank; 2017.
9. Dever LA, Dermody TS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med.* 1991;151:886-95.
10. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens.* 2021;10:1310.
11. Bedenić B. Detekcija beta-laktamaza. *Med Vjesn.* 1993;25:129–34.
12. Bush K, Bradford PA. B-lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6:a025247.
13. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3:15–21.
14. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y i sur. B-lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol.* 2019;431:3472–500.
15. Williams JD.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;12:S3–7.

16. Bonomo RA. B-lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7:a025239.
17. Yocum RR, Rasmussen JR, Strominger JL. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 1980;255:3977-86.
18. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969–76.
19. Bedenić B, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Barišić N, Ladavac R. Karbapenemaze gram-negativnih bakterija. *Liječ Vjesn.* 2014;136:94–103.
20. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:371–9.
21. Kim JY, Jung HI, An YJ, Lee JH, Kim SJ, Jeong SH i sur. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C  $\beta$ -lactamase. *Mol Microbiol.* 2006;60:907–16.
22. Janda JM, Abbott SL. The changing face of the family *Enterobacteriaceae* (order:“*Enterobacterales*”): New members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34:e00174-20.
23. Concia E, Bragantini D, Mazzaferri F. Clinical evaluation of guidelines and therapeutic approaches in multi drug-resistant urinary tract infections. *J Chemother.* 2017;29:19–28.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, second update – 26 September 2019. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2019.
25. World Health Organization [Internet]. Ženeva, Švicarska: World Health Organization; 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [citirano 22. lipnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
26. Magiorakos A-P, 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.
27. European Centre for Disease Prevention and Control. Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2022.

28. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS i sur. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19:56–66.
29. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2017.
30. Tambić Andrašević A, Tambić T, Katalinić-Janković V, Payerl Pal M, Bukovski S, Butić I i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2015.g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2016.
31. Tambić Andrašević A, Payerl Pal M, Skoko Poljak D, Abram M, Andrić N, Baranjec S i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2022.g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2023.
32. Bedenić B, Sardelić S, Luxner J, Bošnjak Z, Varda-Brkić D, Lukić-Grlić A i sur. Molecular characterization of class b carbapenemases in advanced stage of dissemination and emergence of class d carbapenemases in *Enterobacteriaceae* from Croatia. *Infect Genet Evol.* 2016;43:74–82.
33. Bedenić B, Sardelić S, Bogdanić M, Zarfel G, Bader N, Šuto S i sur. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in urinary infection isolates. *Arch Microbiol.* 2021;203:1825–31.
34. Bedenić B, Slade M, Starčević LŽ, Sardelić S, Vranić-Ladavac M, Benčić A i sur. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol.* 2018;67:1031–41.
35. 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.
36. Rubic Z, Jelic M, Soprek S, Tarabene M, Ujevic J, Goic-Barisic I i sur. Molecular characterization of colistin resistance genes in a high-risk ST101/KPC-2 clone of *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital of Split, Croatia. *Int Microbiol.* 2023;26:631–7.
37. Kvesić M, Šamanić I, Novak A, Fredotović Ž, Dželalija M, Kamenjarin J i sur. Submarine outfalls of treated wastewater effluents are sources of extensively- and multidrug-resistant

- KPC- and OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in coastal marine environment. *Front Microbiol.* 2022;13:858821.
38. Peñalva G, Högberg LD, Weist K, Vlahović-Palčevski V, Heuer O, Monnet DL i sur. Decreasing and stabilising trends of antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in segmented regression analysis, European Union/European Economic Area, 2001 to 2018. *Euro Surveill.* 2019;24:1900656.
  39. Tambić Andrašević A, Tambić T, Kalenić S, Katalinić-Janković V, Payerl Pal M. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2008.g. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2008.
  40. Bošnjak Z, Chlebowicz MA, Mareković I, Rezo Vranješ V, Rossen JW, Budimir A. First report of OXA-48–producing *Escherichia coli* in Croatia and confirmed intergenic transfer of a plasmid-carrying blaOXA-48 from *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond).* 2018;50:313–6.
  41. Zayyad H, Eliakim-Raz N, Leibovici L, Paul M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49:536–41.
  42. Wykowski R, Fuentesfria AM, de Andrade SF. Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review. *Arch Microbiol.* 2022;204:535.
  43. Mareković I, Bošnjak Z, Jurić K, Ćorić M, Popović-Grle S. Susceptibility of *Escherichia coli* to nitroxoline, an option for uncomplicated urinary tract infections – the first report from Croatia. *J Chemother.* 2018;30:189–91.
  44. Bergogne-Berezin E, Berthelot G, Muller-Serieys C. Present status of nitroxoline. *Pathol Biol (Paris).* 1987;35:873–8.
  45. Pelletier C, Prognon P, Bourlioux P. Roles of divalent cations and pH in mechanism of action of nitroxoline against *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:707–13.
  46. Fraser, R. S. S., and J. Creanor. 1975. The mechanism of inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-hydroxyquinoline and the antibiotic lomofungin. *Biochem. J.* 1975;147:401–410.
  47. Cherdtrakulkiat R, Lawung R, Nabu S, Tantimavanich S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S i sur. Nitroxoline: a potent antimicrobial agent against multidrug resistant *Enterobacteriaceae*. *EXCLI J.* 2019;18:445–453.
  48. Latrache H, Bourlioux P, Karroua M, Zahir H, Hakkou A. Effects of subinhibitory concentrations of nitroxoline on the surface properties of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha).* 2000;45:485–90.

49. Antić DR, Parčina M, Gobin I, Petković Didović M. Chelation in antibacterial drugs: From nitroxoline to cefiderocol and beyond. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11:1105.
50. Abouelhassan Y, Yang Q, Yousaf H, Nguyen MT, Rolfe M, Schultz GS i sur. Nitroxoline: a broad-spectrum biofilm-eradicating agent against pathogenic bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:247–51.
51. Sobke A, Klinger M, Hermann B, Sachse S, Nietzsche S, Makarewicz O i sur. The urinary antibiotic 5-Nitro-8-hydroxyquinoline (nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:6021–5.
52. Plambeck L, Fuchs F, Sattler J, Hamprecht A. *In vitro* activity of mecillinam, temocillin and nitroxoline against MDR *Enterobacterales*. *JAC Antimicrob Resist*. 2022;4:dlac059.
53. Wijma RA, Huttner A, Koch BCP, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:2916–26.
54. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST [Internet]. Växjö, Švedska: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2024. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [citirano 22. lipnja 2024]. Dostupno na: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
55. Wagenlehner FME, Münch F, Pilatz A, Bärman B, Weidner W, Wagenlehner CM i sur. Urinary concentrations and antibacterial activities of nitroxoline at 250 milligrams versus trimethoprim at 200 milligrams against uropathogens in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:713–21.
56. Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infect Dis*. 2014;14:628.
57. Forstner C, Kwetkat A, Makarewicz O, Hartung A, Pfister W, Fünfstück R i sur. Nitroxoline in geriatric patients with lower urinary tract infection fails to achieve microbiologic eradication: a noncomparative, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:434–5.
58. Fuchs F, Aldejohann AM, Hoffmann AM, Walther G, Kurzai O, Hamprecht AG. *In vitro* activity of nitroxoline in antifungal-resistant *candida* species isolated from the urinary tract. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66:e02265-21.

59. Bojkova D, Zöller N, Tietgen M, Steinhorst K, Bechtel M, Rothenburger T i sur. Repurposing of the antibiotic nitroxoline for the treatment of mpox. *J Med Virol.* 2023;95:e28652.
60. Zhang Z-R, Zhang H-Q, Li X-D, Deng C-L, Wang Z, Li J-Q i sur. Generation and characterization of Japanese encephalitis virus expressing GFP reporter gene for high throughput drug screening. *Antiviral Res.* 2020;182:104884.
61. Laurie MT, White CV, Retallack H, Wu W, Moser MS, Sakanari JA i sur. Functional assessment of 2,177 U.s. and international drugs identifies the quinoline nitroxoline as a potent amoebicidal agent against the pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *MBio.* 2018;9:e02051-18.
62. Spottiswoode N, Pet D, Kim A, Gruenberg K, Shah M, Ramachandran A i sur. Successful Treatment of *Balamuthia mandrillaris* Granulomatous Amebic Encephalitis with Nitroxoline. *Emerg Infect Dis.* 2023;29:197–201.
63. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick i Adelberg / Medicinska mikrobiologija. 26. izdanje. Split: PLACEBO; 2015.
64. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST [Internet]. Växjö, Švedska: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2024. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology [citirano 22. lipnja 2024]. Dostupno na: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
65. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30. izdanje. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
66. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010;2:263;263-274.
67. Shrestha A, Acharya J, Amatya J, Paudyal R, Rijal N. Detection of beta-lactamases (ESBL and MBL) producing Gram-negative pathogens in National Public Health Laboratory of Nepal. *Int J Microbiol.* 2022;2022:1–7.
68. Coris BioConcept [Internet]. Gembloux Belgija: Coris BioConcept; 2024. OKNVI-RESIST-5 [citirano 22. lipnja 2024.]. Dostupno na: <https://www.corisbio.com/products/oknvi-resist-5>
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9. izdanje. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

70. Škerk V, Andrašević AT, Sušić E. Dopune i promjene ISKRA hrvatskih nacionalnih smjernica za liječenje i profilaksu infekcija mokraćnog sustava odraslih. *Infektološki glasnik*. 2014;34:177-81.
71. Mytko N. Antimikrobna osjetljivost karbapenem-rezistentnih izolata *Klebsiella pneumoniae* iz uzoraka donjih dišnih puteva u kliničkom bolničkom centru split u 2022. godini. Split: Sveučilište u Splitu; 2023.
72. Pavišić AD, Barišić Z . Nitroksolin: Učinak na infekcije mokraćnoga sustava uzrokovane bakterijom *Escherichia coli* koja je otporna na kinolone. CroCMID (12. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 9. hrvatski kongres o infektivnim bolestima). Tambić Andrašević Arjana; Barišić, Bruno (ur.). - Zagreb : Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju, Hrvatsko društvo za infektivne bolesti, 2019.
73. Pavišić AD, Barišić Z, Sardelić S. Liječenje uroinfekcija uzrokovanih fluorokinolon-otpornom ESBL-producirajućom *E. coli* - “stari” antibiotici jedini izbor? CroCMID (12. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 9. hrvatski kongres o infektivnim bolestima). Tambić Andrašević Arjana; Barišić, Bruno (ur.). - Zagreb : Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju, Hrvatsko društvo za infektivne bolesti, 2019.
74. Kresken M, Körber-Irrgang B. *In vitro* activity of nitroxoline against *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:7019–20.
75. Fuchs F, Hamprecht A. Susceptibility of carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) to nitroxoline. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:2934–7.
76. Deschner F, Risch T, Baier C, Schlüter D, Herrmann J, Müller R. Nitroxoline resistance is associated with significant fitness loss and diminishes *in vivo* virulence of *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2024;12:e0307923.
77. Dutta C, Pasha K, Paul S, Abbas MS, Nassar ST, Tasha T i sur. Urinary tract infection induced delirium in elderly patients: A systematic review. *Cureus*. 2022;14:e32321.



## **8. SAŽETAK**

**Ciljevi:** Antimikrobna otpornost postala je jedan od glavnih globalnih javnozdravstvenih problema sa ozbiljnim posljedicama za zdravstvo i globalnu ekonomiju. Razvoj i otkriće novih terapijskih opcija jedno je od najjačih alata koje imamo u borbi protiv rasta antimikrobne otpornosti. Svjetska Zdravstvena Organizacija navodi *Enterobacteriaceae* otporne na karbapeneme i *Enterobacteriaceae* koje proizvode ESBL kao kritičnu prioritetnu skupinu za istraživanje novih terapijskih opcija. Cilj ove studije bio je utvrditi antimikrobnu aktivnost nitroksolina prema višestruko otpornim sojevima *E. coli* i *K. pneumoniae*. Preciznije, odrediti aktivnost nitroksolina prema *E. coli* i *K. pneumoniae* koje produciraju ESBL te prema izolatima *K. pneumoniae* koje produciraju karbapenemaze (OXA-48 i KPC).

**Materijali i metode:** Metodom mikrodilucije testirana je aktivnost nitroksolina prema 33 izolata *K. pneumoniae* te je izražena u obliku minimalnih inhibitornih koncentracija. Metodom disk difuzije testirana je osjetljivost 26 izolata *E. coli* na nitroksolin.

**Rezultati:** Raspon MIK-a iznosio je od 16 mg/L do 128 mg/L. Medijan MIK-a iznosio je 32 mg/L ukazujući na visoke vrijednosti MIK-a. Izolati *E. coli* pokazuju izvrsnu osjetljivost prema nitroksolinu pri čemu ih je 25 (96,2%) osjetljivo. Prikupljeni izolati pokazuju nisku razinu osjetljivosti na gotovo sve antibiotike pri rutinskom testiranju osjetljivosti. Visoku razinu osjetljivosti pokazuju nitrofurantoin, fosfomicin i nitroksolin za izolate *E. coli* i ceftazidim-avibaktam za izolate *K. pneumoniae*.

**Zaključci:** Uzimajući u obzir izvrsnu aktivnost koju pokazuje u *in vitro* uvjetima, nitroksolin se pokazuje kao potencijalni lijek izbora za liječenje nekomplikiranih IMS uzrokovanih ESBL *E. coli*. Zbog dobivenih visokih minimalnih inhibitornih koncentracija nitroksolin se nije pokazao kao obećavajući lijek izbora za IMS uzrokovanih MDR *K. pneumoniae*.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** *In vitro* activity of nitroxoline against multidrug resistant *Enterobacteriaceae*

**Objectives:** Antimicrobial resistance has become one of the major global public health concerns with serious consequences for healthcare and the global economy. Developing and discovering new therapeutic options is one of the strongest tools we have in offsetting the rise of antimicrobial resistance. The World Health Organization lists carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and ESBL producing *Enterobacteriaceae* as a critical priority group for the research and development of new antibiotics. The aim of this study was to determine the antimicrobial activity of nitroxoline against multidrug resistant *E. coli* and *K. pneumoniae*. Specifically, to determine the activity of nitroxolin against ESBL producing *E. coli* and *K. pneumoniae* as well as carbapenemase (OXA-48 and KPC) producing *K. pneumoniae*.

**Materials and methods:** The activity of nitroxoline against 33 *K. pneumoniae isolates* was assessed using the microdilution method and expressed as minimal inhibitory concentrations. The sensitivity of 26 *E. coli* isolates to nitroxoline was assessed using the disk diffusion method.

**Results:** The range of MICs was 16 mg/L to 128 mg/L with the median being 32 mg/L indicating high MIC values. ESBL *E. coli* isolates show excellent sensitivity to nitroxoline, with 25 (96,2%) isolates being sensitive. Isolates exhibit low susceptibility to almost every routinely tested antibiotic. High susceptibility can be seen in *E. coli* isolates for nitrofurantoin, fosfomycin and nitroxoline and in *K. pneumoniae* isolates for ceftazidime-avibactam.

**Conclusions:** Considering the excellent *in vitro* activity of nitroxoline against ESBL *E. coli* isolates, it presents as a potential drug of choice for the treatment of uncomplicated UTIs caused by ESBL *E. coli*. The obtained MIC values are high indicating low activity of nitroxoline against the tested MDR *K. pneumoniae* isolates.