

Kolistin, polipeptidni antibiotik zadnje obrane protiv invazivnih Gram-negativnih bakterija



Nina Bilandžić*, Ivana Varenina, Božica Solomun Kolanović, Đurđica Božić Luburić, Ines Varga i Svetlana Terzić

Uvod

Polimiksini su polipeptidi, proizvodi fermentacije bakterije *Bacillus polymyxa* čija je antibakterijska aktivnost prepoznata u četrdesetih godina prošlog stoljeća. Skupina su polipeptidnih antibiotika od 5 kemijski različitih spojeva (polimiksina A-E). U kliničkoj praksi korišteni su samo polimiksin B i polimiksin E, odnosno kolistin. Kolistin je baktericidni antibiotik širokog spektra djelovanja protiv Gram-negativnih bakterija sastavljen od mješavine kolistina A i kolistina B koji se razlikuju po bočnom lancu masnih kiselina. Prvi put primijenjen je 1952. godine i korišten je sve do ranih 1980-ih za liječenje infekcija prouzročenih Gram-negativnim bacilima. Korišten je u Japanu i Europi tijekom 1950-ih i Sjedinjenim Američkim Državama u obliku natrijevog kolistimetata (Reed i sur., 2001.). Zbog značajnih nuspojava polimiksini su se rijetko koristili od 1970-ih kada su se na tržištu pojavili manje toksični aminoglikozidi i drugi antibiotici (Lim i sur., 2010.). Zbog izvješća o visokoj incidenciji nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti parenteralna uporaba formulacije kolistina i polimiksina B je

prekinuta osamdesetih godina prošlog stoljeća u većini zemalja (Falagas i Kasiakou, 2005.). Intravenozno se kolistin primjenjivao jedino u liječenju pacijenata s infekcijom pluća Gram-negativnim bakterijama, odnosno cističnom fibrozom (Cunningham i sur., 2001.).

Danas širom svijeta postoji veliki problem pojava teških infekcija Gram-negativnim bakterijama otpornih na većinu klasa komercijalno dostupnih antibiotika kao i nedostatak novih antibiotika s aktivnošću protiv tih bakterija (Walsh i Toleman, 2012.). Stoga su ponovno razmotrene terapijske mogućnosti polimiksina i došlo je do ponovne uporabe ovih polipeptidnih antibiotika, odnosno polimiksina B i kolistina (Falagas i Kasiakou, 2005., Michalopoulos i Karatzas, 2010., Roberts i sur., 2015.). Studije bolesnika koji su intravenozno primali polimiksin B i kolistin za liječenje teških infekcija *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, uključujući pneumonije, bakterijemiju i infekcije mokraćnog sustava, pokazale da ovi antibiotici imaju prihvatljivu učinkovitost i znatno manju

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ*, (dopisni autor, e-mail: bilandzic@veinst.hr), dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. primj. kem., dr. sc. Svetlana TERZIĆ, dr. med. vet., docentica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

toksičnost od onih zabilježenih u starijim istraživanjima (Markou i sur., 2003., Falagas i Kasiakou, 2005.).

Kemijska struktura i mehanizam djelovanja kolistina

Po svojoj strukturi kolistin je kationski ciklički dekaeptid vezan na lanac masnih kiselina preko α -amidne veze (Slika 1). Aminokiselinske komponente u njegovoj molekuli su D-leucin, L-treonin i L- α - γ -diamino-maslačna kiselina koja je vezana s ostatkom masne kiseline koji je 6-metil-oktanska kiselina (kolistin A) ili 6-metil-eptanska kiselina (kolistin B) (Falagas i Kasiakou, 2005.). Različiti farmaceutski pripravnici kolistina mogu sadržavati različite količine ovih dviju komponenata (kolistin A ili B) (Decolin i sur., 1997.). Komercijalno su dostupna dva oblika kolistina: kolistin sulfat i natrijev kolistimetat (također naziva kolistin metansulfat, pentanatrijev kolistimetansulfat i kolistin sulfonilmetat). Kolistin sulfat se u humanoj medicini primjenjuje oralno (tablete ili sirup) za liječenje crijevnih infekcija i lokalno kao prašak za liječenje bakterijskih infekcija kože, dok je u veterinarskoj medicini najčešće u obliku praška topljivog u vodi za piće, otopine ili premiksa. Natrijev kolistimetat je manje potentan i manje toksičan od kolistin sulfata. Dostupan je u parenteralnim

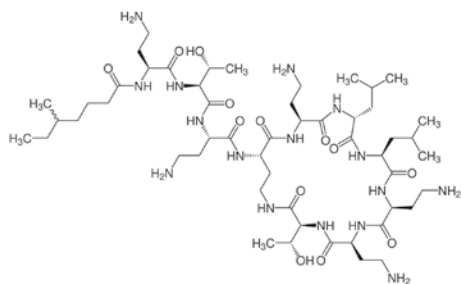
formulacijama i može se primijeniti intravenozno, intramuskularno ili nebulizacijom (Falagas i Kasiakou, 2005.).

Mehanizam antimikrobne aktivnosti kolistina je djelovanje na bakterijsku staničnu membranu. Povezivanje kolistina s bakterijskom membranom događa se kroz elektrostatske interakcije između kationskog polipeptida kolistina i anionskih lipopolisaharida (LPS) u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija, što dovodi do poremećaja stanične membrane. Kolistin zamjenjuje magnezij (Mg^{+2}) i kalcij (Ca^{+2}), koji normalno stabiliziraju LPS molekule od negativno nabijenog LPS, a to dovodi do poremećaja vanjske membrane. Rezultat je povećanje propusnosti ovojnice stanica, curenja staničnog sadržaja i na kraju smrti stanice (Falagas i Kasiakou, 2005.).

Uz izravnu antibakterijsku aktivnost, kolistin ima i snažnu anti-endotoksin aktivnost. Endotoksin Gram-negativnih bakterija je dio lipida A LPS molekule, a kolistin veže i neutralizira LPS. Značenje ovog mehanizma za *in vivo* antimikrobno djelovanje kroz sprječavanje sposobnosti endotoksina da inducira šok kroz oslobađanje citokina još nije jasno (Gough i sur., 1996.).

Farmakokinetička i farmakodinamička svojstva kolistina

U starijim istraživanjima u utvrđivanju farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava kolistina uglavnom su korištene mikrobiološke metode za mjerenje koncentracija lijeka i njegovih derivata (Falagas i Kasiakou, 2005.). Tim metodama nije bilo moguće diferencirati natrijev kolimestat iz kolistina (Li i sur., 2003.a). Problem je vezan i za činjenicu da se pripravnici kolistina različitih proizvođača ili čak u različitim dijelovima istog proizvođača razlikuju u sadržaju te imaju različite omjere kolistina A i B (Li i sur., 2003.a).



Slika 1. Kemijska struktura kolistina

Polimiksin B i kolistin imaju gotovo identične kemijske strukture i usporedive mehanizme djelovanja i spektre aktivnosti. Međutim, znatno se razlikuju po farmakokinetici i farmakodinamici. Kolistin sulfat i natrijev kolistimetat ne apsorbiraju se u gastrointestinalni sustav nakon oralne primjene. U vodenim otopinama, natrijev kolistimetat hidrolizira i tvori kompleksnu smjesu djelomično sulfometiliranih derivata i kolistina (Falagas i Kasiakou, 2005.). Različiti režimi temperature i vremena prouzročiće da različiti omjeri natrijevog kolistimetata hidroliziraju u kolistin. U *in vitro* studiji utvrđeno je da u ljudskoj plazmi u vremenu od 4 h na 37 °C dolazi do hidrolize 31,2% natrijevog kolistimetata u kolistin (Li i sur., 2003.b). Otopine soli kolistina su relativno stabilne pri pH 2 do 6, ali postaju nestabilne pri pH većem od 6. Primarni put izlučivanja je glomerularnom filtracijom (Li i sur., 2003.c, 2004.). U ljudi se približno 60% natrijevog kolistimetata izlučuje nepromijenjeno urinom tijekom prvih 24 sata nakon primjene, a izlučivanje putem žuči nije zabilježeno. U istraživanju pacijenata s cističnom fibrozom koji su intravenski primili natrijev kolistimetat u dozi 160 mg (2 milijuna IU) svakih 8 h (tjelesna masa > 50 kg) ili 80 mg (1 milijun IU) svakih 8 h (tjelesna masa < 50 kg), srednji (\pm SD) poluživot natrijevog kolistimetata bio je 124 ± 52 min, a srednji poluživot kolistin sulfata bio je 251 ± 79 min. Utvrđeno je srednje tjelesno otpuštanje od $2,0 \pm 0,5$ mL/min/kg, odnosno prosječna raspodjela natrijevog kolistimetata 340 ± 95 mL/kg (Li i sur., 2003.b).

Nakon oralne primjene životinjama kolistin se izlučuje izmetom i to uglavnom nepromijenjen, a važno je naglasiti da se dugo zadržava u zemlji.

Prijašnja istraživanja su pokazala da se kolistin čvrsto veže za membranske lipide stanica mnogih tjelesnih tkiva, uključujući jetru, pluća, bubrege, mozak, srce i mišiće (Kunin i Bugg, 1970.).

Otpuštanje vezanog lijeka iz tkiva je vrlo sporo i dulje je od 5 dana nakon posljednje primijenjene doze. U istraživanjima u štakora, pasa i teladi utvrđeno je da je oko 55% kolistina vezano za proteine plazme nakon intravenske primjene kolistina (Ziv i sur., 1982.). Kolistin sulfat i natrijev kolistimetat pokazuju svoje baktericidno djelovanje ovisno o koncentraciji (Li i sur., 2003.a).

Danas se još uvijek provode istraživanja o farmakološkim razlikama između polimiksina B1, polimiksina B2, kolistina A i kolistina B, glavnih cikličkih lipopeptidnih komponenti prisutnih u polimiksinu B i proizvodima kolistina (Roberts i sur., 2015.).

Aktivnost kolistina

Kolistin je u liječenju bakterijskih infekcija u ljudi pokazao izvrsnu baktericidnu aktivnost protiv različitih Gram-negativnih aerobnih bacila, uključujući vrste *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii* i *Haemophilus influenzae* (Falagas i Kasiakou, 2005.). Pokazao je i značajnu *in vitro* aktivnost protiv sojeva *Stenotrophomonas maltophilia*, odnosno 83% do 88% ispitanih izolata bilo je podložno kolistinu (Hogardt i sur., 2004.). Zabilježeno je i da je kolistin potencijalno aktivan protiv nekoliko mikobakterijskih vrsta, uključujući *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei* i *Mycobacterium smegmatis* (Rastogi i sur., 1988., Falagas i Kasiakou, 2005.).

Vrste *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Brucella*, *Pseudomonas mallei* i *Burkholderia cepacia* su vrlo otporne na kolistin, a nije djelotvoran ni protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih aerobnih koka, Gram-pozitivnih aerobnih bacila, svih anaeroba, gljivica i parazita (Catchpole i sur., 1997.).

U nedavnoj studiji *in vitro* i *in vivo* o antimikrobnoj aktivnosti i toksičnosti glavnih lipopeptidnih komponenti utvrđeno je da sva četiri lipopeptida polimiksin B1, polimiksin B2, kolistin A i kolistin B, imaju usporedive minimalne inhibitorne koncentracije (MICs) ($<0,125 - 4$ mg/L) kliničkih Gram-negativnih izolata. Istraživanje provedeno u *in vivo* mišjim modelima pokazuje da glavne cikličke lipopeptidne komponente prisutne u polimiksinu B i proizvodima kolistina (polimiksin B1, polimiksin B2, kolistin A i kolistin B) pokazuju sličnu antimikrobnu aktivnost, ali i nefrotoksičnost, odnosno blago do umjereno oštećenje tkiva. Međutim, polimiksin B1 i kolistin A su pokazali značajno veći (> 3 puta) *in vitro* apoptotički učinak na ljudske bubrežne proksimalne tubularne HK-2 stanice nego polimiksin B2 i kolistin B. U usporedbi s komercijalnim polimiksinima i kolistinskim proizvodima, pojedinačne lipopeptidne komponente imale su malo više *in vivo* antimikrobne aktivnosti. Rezultati ukazuju na potrebu ponovnog procjenjivanja farmakopejskih standarda za polimiksin B i kolistin i standardiziranje sastava različitih komercijalnih proizvoda polimiksinских antibiotika (Roberts i sur., 2015.).

Vezano za doziranje kolistina u ljudi i danas postoji potreba za studijama optimizacije režima doziranja i učinkovitosti (Lim i sur., 2010.). Ostaju nedorečena pitanja vezana na odgovarajući raspored doziranja, koliko dugo treba trajati doziranje i s kojim bi se antibioticima trebali koristiti (Bergen i sur., 2011.). I dalje postoji nedostatak dokumentiranog iskustva s lijekom, a dostupnost raznih oblika polimiksina u različitim koncentracijama pa čak i jedinicama koje se koriste u različitim shemama doziranja također stvaraju probleme u uporabi. Stoga su neophodna dodatna istraživanja u smjeru razvoja poboljšanih formulacija

kolistina, definiranju optimalne strategije doziranja, uključujući ukupnu dnevnu dozu, način davanja i intervala doziranja (Pulcini i sur., 2012.).

U veterinarskoj medicini kolistin se koristi samo za liječenje crijevnih infekcija prouzročenih neinvazivnom *E. coli* u teladi, janjadi, svinja, kokoši i purana te kunića, ali ga je moguće koristiti i za metafilaksu. Međutim, prije primjene kolistina u svrhu metafilakse potrebno je utvrditi bolest u stadu ili jatu kako bi se opravdala njegova primjena na sve jedinke. Profilaktička primjena kolistina nije dopuštena niti za jednu ciljnu vrstu. Prema novijim uputama i saznanjima kolistin se ne smije primjenjivati niti konjima, posebice ždrjebadi, jer u njih može prouzročiti kolitis (kolitisX). Takav kolitis je posljedica disbioze (*Clostridium difficile*) i za ždrijebe može biti fatalan. Uporaba kolistina u veterinarskoj medicini nije opravdana ni za liječenje infekcija prouzročenih *Salmonella* spp.

Prema brojnim istraživanjima preporučena doza kolistina za telad, janjad, i svinje je 100000 IJ kolistina/kg tjelesne mase, a za perad 75000 IJ /kg tjelesne mase u vodi za piće tijekom tri do pet uzastopnih dana. Iako se kolistin slabo apsorbira iz crijeva veće količine i duže davanje lijeka se ne preporučuju te je stoga dopušteno trajanje liječenja najviše sedam dana.

Zbog izuzetnog značenja kolistina u humanoj medicini, prije odluke o korištenju kolistina u životinja za hranu potrebno je napraviti antibiogram kako bismo bili sigurni da je kolistin jedini izbor.

Toksičnost i štetni učinci kolistina

Nefrotoksičnost i neurotoksičnost su najčešći neželjeni učinci u ljudi, a ovisni su o dozi i obično su reverzibilni nakon ranog prekida terapije. Toksičnost za bubrege uključuje akutnu tubularnu nekrozu koja se očituje kao smanjenje

klirensa kreatinina i povećanje razina uree i kreatinina u serumu. Neurološka toksičnost očituje se kao vrtoglavica, slabost, periferna i parestezija lica, vizualni poremećaj, konfuzija, ataksija i neuromuskularna blokada, što može dovesti do respiratornih blokada ili apneje. Najčešće se u literaturi spominje parestezija (oko 7%) kao glavni neurotoksični štetni utjecaj povezan s kolistinom. Druge nuspojave koje su prijavljene uz uporabu kolistina uključuju reakcije preosjetljivosti, svrbež, osip na koži, urtikariju, groznicu i blage gastrointestinalne poremećaje te alergijske reakcije u oko 2% pacijenata (Falagas i Kasiakou, 2005.). Ustvrđeno je da se razvoj neurotoksičnih učinaka povezanih s kolistinom češće pojavljuje u bolesnika s cističnom fibrozom (oko 29%), s učincima parestezije, ataksije ili oboje (Reed i sur., 2001.).

Prvotna izvješća u terapijama s kolistinom u ljudi pokazala su visoku učestalost nefrotoksičnosti i od 20,2% (Koch-Weser i sur., 1970.). Kasnije se ističe da je nefrotoksičnost povezana s kolistinom manje istaknuta nego što se prije mislilo (Markou i sur., 2003., Falagas i sur., 2005.). Međutim, u studijama provedenim isključivo na pacijentima u jedinicama intenzivne skrbi koji su primili 3 milijuna IU kolistina intravenski svakih 8 h, incidencija nefrotoksičnosti bila je 18,6% i 14,3% (Falagas i sur., 2005., Michalopoulos i sur., 2005.). Nadalje, u samo 8% pacijenata iz jedinice intenzivne njege i kirurških odjela bolnice, koji su primili prosječno 4,5 milijuna IU kolistina intravenski u trajanju od 21,3 dana, razvila se nefrotoksičnost (Kasiakou i sur., 2005.). Moguća objašnjenja za utvrđene razlike između starih i najnovijih izvješća o bubrežnoj toksičnosti mogu biti zbog poboljšanja terapije te praćenja funkcije bubrega i izbjegavanja drugih agenasa s poznatom nefrotoksičnosti kao i zbog korištenja različitih formulacija kolistina, za razliku od prije korištenog kolistin

sulfata koji je toksičniji od natrijevog kolistimetata za intravensku uporabu (Falagas i Kasiakou, 2005.).

U istraživanjima utjecaja kolistina na stupanj pojave nefrotoksičnosti u ljudi postoje velike varijacije u rasponu od 0% do 53,5%. Naime, to je posljedica toga što nisu uzeti u obzir svi faktori rizika te utvrđene kombinacije pacijenata sa i bez bubrežne disfunkcije na početku tih studija (Spapen i sur., 2011.). U studijama u kojima su utvrđeni bolesnici s normalnom i smanjenom funkcijom bubrega prije početka kolistinskog liječenja, incidencija nefrotoksičnosti bila je 2,5 do 7 puta veća u bolesnika s početnom smanjenom funkcijom bubrega (Kasiakou i sur., 2005., Michalopoulos i sur., 2005.).

U slučajevima bolesnika s cističnom fibrozom u kojih je istovremeno primijenjen kolistin s aminoglikozidom potenciran je poremećaj bubrega dok pri primjeni samo kolistina ili u kombinaciji s drugim antibioticima incidencija nefrotoksičnosti nije bila visoka (Aloul i sur., 2005.).

Primjena kolistina s drugim antibioticima

U suvremenim klinikama danas se kolistin primjenjuje u kombinaciji s drugim antibioticima što daje obećavajuće rezultate za povećanu antibakterijsku učinkovitost u liječenju infekcija u ljudi. Stoga se pretpostavlja da će kolistin u 21. stoljeću biti jedan od antibiotika "posljednje obrane" protiv Gram-negativnih patogena rezistentnih na više farmakološki djelatnih tvari (Biswas i sur., 2012.). Eksperimentalne i kliničke studije pokazale su sinergističku aktivnost kolistina s drugim antimikrobnim sredstvima protiv Gram-negativnih bakterija rezistentnih na više antibiotika (engl. *multidrug-resistant*, MDR). Ustvrđeno je da kombinacija kolistina s azlocinom, piperacilinom, aztreonamom, ceftazidimom, imipenemom

ili ciprofloksacinom učinkovitija od monoterapije kolistinom u bolesnika s cističnom fibrozom s kroničnom plućnom infekcijom zbog MDR *P. aeruginosa* (Falagas i Kasiakou, 2005.). U više studija na ljudima potvrđena je sinergijska aktivnost kolistinom s drugim antibioticima prema sojevima MDR *P. aeruginosa*, odnosno s ceftazidimom (Gunderson i sur., 2003.), rifampinom i amikacinom u liječenju imunosupresiranog bolesnika s višestrukim apscesima pluća, perineuma i gluteusa (Tascini i sur., 2000.), odnosno s rifampinom (Tascini i sur., 2004.).

Provedeno je istraživanje primjene kolistinom na temelju upitnika upućenih epidemiolozima, farmaceutima, mikrobiolozima te liječnicima intenzivne njege u bolnicama u svim dijelovima svijeta. Pri tome je oko polovica ispitanika bila iz bolnica s više od 500 kreveta. Većina bolnica uključenih u studiju imala je jedinicu intenzivnog liječenja (89,4%), odjel kirurgije (92,6%) i mikrobiološki laboratorij (91,9%). Općenito je utvrđeno da se kolistin koristi za teške infekcije prouzročene Gram-negativnim MDR bakterijama, kao što su *A. baumannii* i *P. aeruginosa*. Ustvrdeno je da ispitanici u 11 od 56 zemalja nisu imali pristup kolistinom. Nedostatak pristupa kolistinom

je bio izviješten sa svih kontinenata osim Oceanije i Sjeverne Amerike. Zemlje u kojima se nije koristio kolistin su: Bolivija, Gvatemala, Indonezija, Laos, Norveška, Portugal, Rusija, Uzbekistan, Venezuela, Vijetnam i Jemen. Dostupni su i upotrijebljeni razni oblici polimiksinih lijekova u cijelom svijetu. Većina ispitanika koristila je natrijev kolistimetat (48,6%), zatim kolistin sulfat (14,1%), oba oblika kolistinom (1,4%) i polimiksina B (1,4%), dok ostali nisu znali točnu formulaciju (Wertheim i sur., 2013.).

U istraživanju primjene kolistinom ispitano je i koji se drugi lijekovi najčešće koriste u kombinaciji s kolistinom (Tabela 1). Najčešća kombinacija bila je s karbapenemom. Ostale relativno česte kombinacije su bile aminoglikozidi, tigeciklin, rifampicin i piperacilin/tazobaktam. Izbor drugog antibiotika ovisi o vrsti infekcije koja se liječi i profilu osjetljivosti kultiviranih bakterija. Prema većini ispitanika ankete, najvažniji lijekovi koji se kombiniraju s polimiksinihama za proučavanje u kliničkom ispitivanju smatraju se tigeciklin i piperacilin/tazobaktam (Wertheim i sur., 2013.).

Dok se u humanoj medicini postižu dobri rezultati u liječenju infekcija

Tabela 1. Lijekovi koji se koriste za kombiniranu terapiju s kolistinom u humanoj medicini (Wertheim i sur., 2013.).

Antibiotici koji se koriste s kolistinom	Frekvencija primjene (%)		
	Nikada	Rijetko	Često
Karbapenem	24,5	31,7	43,8
Gentamicin	41,3	38,8	20,2
Tigeciklin	47,4	34,2	18,4
Rifampicin	51,9	29,8	18,3
Piperacilin/tazobaktam	49,3	35,5	15,2
Fluorokinolin	52,8	39,6	7,7
Fosfomicin	81,5	12,0	6,5
Minociklin	81,1	14,5	4,4
Drugi (cefalosporini, trimetoprim/sulfametoksazol, glikopeptidi, linezolid i doksiciklin)	64,3	23,1	12,6

kolistinom u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima, u veterinarskoj medicini kombinacije s kolistinom nisu dopuštene budući da podatci brojnih studija u kojima je korištena kombinacija kolistina s drugim djelatnim tvarima nije pokazala bolju učinkovitost od primjene monoterapijekolistinom. Zbog navedenog i potencijalnog rizika za zdravlje ljudi zbog pojave rezistencije bakterija na kolistin, preporučeno je da se zabrane svi veterinarsko-medicinski proizvodi za oralnu primjenu koji uz kolistatin sadržavaju i neku drugu djelatnu tvar, a namijenjeni su životinjama za hranu. Posebice se to odnosi na kombinacije kolistina i drugih farmakološki djelatnih tvari koje se nisu koristile za liječenje isključivo gastrointestinalnih infekcija budući da se kolistin slabo apsorbira te je stoga upitna uporaba ovakvih kombinacija.

Rezistencija bakterija na kolistin

Gram-negativne bakterije mogu razviti rezistenciju na kolistin putem mutacija ili mehanizama prilagodbe. Mutacija je naslijeđena, niska, i neovisna o kontinuiranoj prisutnosti antibiotika, dok je prilagodba suprotna (Moore i Hancock, 1986., Groisman i sur., 1997.). Istraživanja sojeva *Pseudomonas aeruginosa* otpornih na polimiksine sugeriraju na promjene vanjske membrane bakterijskih stanica (redukcija LPS-a, smanjene razine specifičnih proteina vanjske membrane, smanjenje sadržaja Mg^{+2} i Ca^{+2} u stanicama, promjene lipidna) odnose se na razvoj rezistencije (Moore i Hancock, 1986., Denton i sur., 2002.).

Rezistentnost kolistina u invazivnim *E. coli* i invazivnim *K. pneumoniae* u ljudi, iako vrlo niska, bila je povezana s potrošnjom kolistina u ljudi. Povezanost između potrošnje polimiksina u ljudi (osobito u bolnici) i rezistencije na polimiksine u invazivnom *K. pneumoniae*

nije iznenađujuće, budući da je uporaba kolistina jedini neovisni čimbenik rizika za stvaranje kolistin rezistentnih *Enterobacteriaceae* koje proizvode karbapenemazu (β -laktamaza) u kontroliranim studijama (Brink i sur., 2013., EMA/AMEG, 2016.).

Znatno povećanje potrošnje kolistina u bolničkom sektoru zabilježeno je u nekoliko zemalja između 2011. i 2015. godine, najvjerojatnije kao rezultat MDR-a i sve veće učestalosti Gram-negativnih infekcija otpornih na karbapenem. U zemljama koje imaju visoku razinu rezistencije na više lijekova, uključujući otpornost na karbapeneme, ostaje dostupno tek nekoliko terapijskih opcija, među kojima je kolistin zadnja opcija pomoći. Polovica potrošnje kolistina u ljudi javlja se u bolničkom sektoru gdje je rezerviran za liječenje MDR Gram-negativnih infekcija. Zemlje s trenutačno visokim postotkom rezistencije na karbapenem ukazuju na veliki broj izolata s kombiniranom rezistencijom na karbapenem i kolistin, što ukazuje na daljnji gubitak učinkovitih mogućnosti liječenja Gram-negativnih bakterijskih infekcija (EFSA, 2018.).

Naime, općenito gledajući, konstantna uporaba antibiotika u farmskom uzgoju životinja prouzročila je stvaranje rezistentnih gena u bakterija koje čine prirodnu mikrobnu populaciju u životinja. Stoga se smatra da se uporaba veterinarskih lijekova treba kontrolirati kako bi se smanjio rizik razvoja pojava rezistentnih vrsta bakterija. Europska agencija za sigurnost hrane i Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti su na temelju podataka 28 zemalja članica EU za 2016. godinu izradili izvještaj o antimikrobnoj rezistenciji indikatorskih bakterija izolata iz ljudi i peradi (EFSA, 2018.).

Niske razine rezistentnosti na kolistin utvrđene su za *Salmonella* i *E. coli* iz izolata peradi. Ukupna rezistencija na kolistin za *Salmonella* spp. iz mesa tovnih pilića

iznosila je 1,4%. *E. coli* iz mesa tovnih pilića i puretine pokazala je rezistenciju na kolistin od ukupno 1,7%, odnosno 5,7% (EFSA, 2018.).

Isto je tako niska i stopa rezistencije na kolistin određena za *Salmonelle* u izolatima iz ljudi. Veći je stupanj rezistencije na kolistin uočen za *S. enteritidis* nego kod drugih *Salmonella* serovara. Tako je rezistencija na kolistin detektirana u 6,2% izolata od koji se 85% rezistentnih izolata odnosilo na *S. enteritidis* ili *S. dublin*. Najveći udio rezistencije kod izolata *S. enteritidis* iz ljudi bio je utvrđen za nalidiksičnu kiselinu (18,4%), kolistin (17,5%) i ciprofloksacin/pflokksacin (12,3%) (EFSA, 2018.).

Europska agencija za lijekove (EMA) preporučila je da se lijekovi koji sadrže kolistin trebaju koristiti samo kao tretman drugog reda u životinja, te da bi se njihova prodaja trebala svesti na minimum u svim državama članicama EU kako bi se smanjio rizik od antimikrobne rezistencije. Europska komisija zatražila je ažuriranje obzirom na korištenje kolistina zbog otkrića novog mehanizma rezistencije bakterija na kolistin. Za rezistenciju je odgovoran gen *mcr-1* koji se može prenijeti između različitih tipova bakterija te time prouzroči brz razvoj rezistencije. Ovaj gen je prvi put identificiran u bakterijama *Enterobacteriaceae* u Južnoj Kini, a od tada je pronađen i u EU te u drugim regijama (EMA, 2016.). Rezistencija na kolistin u *E. coli* i *K. pneumoniae* može se pojaviti kroz kromosomske mutacije, putem bakterijske stanične kapsule, ili kroz stjecanje prijenosnog gena za rezistenciju (npr. gen rezistencije na kolistin *mcr-1*). Nedavno provedene studije u Njemačkoj pokazale su da doprinos *mcr-1* posredovane prenosive rezistencije na fenotipsku kolistinsku otpornost može biti znatna na životinjama, posebno u peradi (ECDC/EFSA/EMA, 2017.).

EMA je propisala mjere za smanjenje rizika od antimikrobne rezistencije

nakon veterinarske uporabe kolistina te je preporučila da bi tijekom sljedećih nekoliko godina sve države članice EU trebale smanjiti uporabu kolistina u životinja, barem na ciljnoj razini od 5 mg kolistina/jedinici korekcije populacije PCU (engl. *population correction unit*, PCU) procijenjenu prema težini stoke i zaklanih životinja. Ako bi se to uspješno primijenilo moglo bi se postići ukupno smanjenje od oko 65% u trenutnoj prodaji kolistina za veterinarsku uporabu na razini EU. Države članice također se potiču da postave strože nacionalne ciljeve, idealno ispod 1 mg kolistina/PCU (EMA, 2016.).

Primjena kolistina u veterinarskoj medicini

Natrijev kolistimetat koristi se više od 50 godina u ljudi i životinja. U veterinarskoj medicini, kolistin je korišten u liječenju infekcija prouzročenih *Enterobacteriaceae* spp. na farmama. Danas je jedan od pet najčešće korištenih antibiotika u životinja za hranu unutar EU (EMA, 2016.). Njegova se uporaba povećala posljednjih godina djelomično i zbog razvoja otpornosti na druge klase antibiotika.

U Republici Hrvatskoj kolistin se koristi u formi kolistin sulfata u liječenju i metafilaksi crijevnih infekcija prouzročenih neinvazivnom *E. coli* osjetljivom na kolistin u goveda, svinja, kokoši i purana (Ministarstvo poljoprivrede, 2018.). Na tržištu u R. Hrvatskoj odobreno je više gotovih veterinarsko-medicinskih proizvoda, prašaka za primjenu u vodi za piće različitih proizvođača. Uvažavajući službene preporuke u Republici Hrvatskoj nema odobrenih kombinacija kolistina i drugih djelatnih tvari za liječenje životinja kao ni veterinarsko medicinskih proizvoda s kolistinom za parenteralnu primjenu.

Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC), Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) i Europska agencija za lijekove (EMA) zajedno su izradili izvješće o integriranim analizama potencijalnih odnosa između potrošnje antimikrobnih sredstava i pojavljivanja bakterijske antimikrobne rezistencije u ljudi i životinja koje hranu (ECDC/EFSA/EMA, 2017.). Potrošnja kolistina u životinjama namijenjenih za hranu daleko je veća od one u ljudi. Međutim, uzimajući u obzir potrošnju kolistina u bolnicama u ljudi, utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost između ukupne potrošnje kolistina u bolnicama i rezistencije invazivne *Klebsiella pneumoniae* na kolistin.

Postoje velike razlike u potrošnji kolistina za životinje između zemalja, a neke zemlje nisu ni koristile polimiksine u liječenju životinja za hranu (ECDC/EFSA/EMA, 2017.). U svrhu utvrđivanja mogućeg odnosa između potrošnje polimiksina i rezistencije na kolistin za 2014. i 2015., uspoređena je rezistencija indikatorske *E. coli* iz životinja za hranu s potrošnjom polimiksina u tih životinja koja je izražena u mg po kilogramu procijenjene biomase. Korišteni su podatci prosječne potrošnje tijekom 2014. i 2015. na razini 26 članica EU, a u studiju je bila uključena i Hrvatska. U istraživanju su korišteni podatci za kategorije životinja koje proizvode hranu, odnosno za brojlere, purane, svinje i telad za razdoblje 2014.-2015. Potrošnja polimiksina kretala se između nekoliko jedinica i do gotovo 40 mg po kilogramu procijenjene biomase. Analiza je pokazala statistički značajnu pozitivnu povezanost između rezistencije indikatorske *E. coli* na kolistin i potrošnje polimiksina za životinje u promatranom razdoblju. Procijenjeno je da je rezistencija *E. coli* na kolistin u svinja na vrlo niskoj razini (18 zemalja u studiji), dok je u peradi razina rezistencije bila uglavnom nešto viša od one u svinja, iako je i dalje niska. Za

2015. procijenjeno je da postoji značajna pozitivna povezanost između potrošnje polimiksina i rezistencije na kolistin u indikatorskoj *E. coli* u svinja. Također je za 2014. godinu utvrđena značajna pozitivna povezanost između potrošnje polimiksina i rezistencije na kolistin u *E. coli* u peradi (ECDC/EFSA/EMA, 2017.).

EMA je izradila izvješće o prodaji antimikrobnih veterinarskih lijekova za 29 članica EU i dodatno Švicarske u 2015. godini. Prikazala je trendove povećanja, odnosno smanjenja prodaje lijekova u razdoblju od 2010. do 2015. U 2015. godini se u R. Hrvatskoj prodalo ukupno 27,9 tone farmakoloških djelatnih tvari za primjenu u životinja za hranu. Primjer države članice EU s velikom proizvodnjom životinja je Španjolska koja je imala prodaju od 3027,8 tone. Na razini EU u 2015. godini je prodaja polimiksina, odnosno kolistina kao predstavnika svih polimiksina, izražena u mg prodanih po jedinici korekcije populacije (engl. *population correction unit*, PCU), činila 6,8% ukupne prodaje. U Tabeli 2 su prikazani trendovi prodaje polimiksina u 2014. i 2015. godini za članice EU. U Hrvatskoj je u 2015. zabilježena prodaja polimiksina činila 2,5% ukupne prodaje, u usporedbi s primjerice prodajom tetraciklina koja je činila 41% ukupne prodaje. Zabilježen je pad prodaje polimiksina u 2015. u odnosu na 2014. sa 4,0 mg/PCU na 2,56 mg/PCU. Srednja vrijednost prodaje polimiksina za 25 zemalja EU je 9,54 mg/PCU. EMA ekspertna skupina stručnjaka za antimikrobno savjetovanje (AMEG) preporuča postizanje prodaje od 5 mg/PCU za članice EU (EMA, 2017.).

U Španjolskoj je u 2010. i 2015. godini prodaja polimiksina iznosila 12,7% i 8,7% ukupne prodaje. U 2015. prodaja polimiksina iznosila je 34,9 mg/PCU. U Danskoj je prodaja polimiksina u 2015. godini za životinje koje proizvode hranu bila općenito niska i činila je oko 1,3% ukupne prodaje. Međutim, od 2010. do 2015. godine ukupna prodaja (mg/PCU)

Tabela 2. Prodaja polimiksina u pojedinim članicama EU u 2014. i 2015. godini.

Članice EU (n=29) i Švicarska	Prodaja polimiksina (mg/PCU)	
	2014.	2015.
Austrija	1,45	1,62
Belgija	1,65	2,80
Bugarska	0,5	3,60
Cipar	11,2	12,4
Češka Republika	0,9	10,5
Danska	0,42	0,53
Estonija	3,2	1,53
Finska	0,18	0,14
Francuska	7,0	4,1
Hrvatska	4,0	2,56
Grčka	-	3,3
Mađarska	7,0	9,5
Island	0,0035	0,003
Irska	0,36	0,41
Italija	29,0	26,1
Latvia	0,75	0,94
Litva	0,2	0,61
Luksemburg	2,5	1,5
Njemačka	12,5	8,0
Nizozemska	0,47	0,48
Norveška	0,0073	0,0059
Poljska	5,0	5,9
Portugal	17,5	12,1
Rumunjska	6,5	7,4
Slovačka	1,5	1,14
Slovenija	0,5	0,1
Španjolska	36,0	34,9
Švedska	0,09	0,11
Švicarska	0,9	0,65
Ujedinjeno Kraljevstvo	0,15	0,15

polimiksina u Danskoj se povećala za oko 102%, a razlog za ovo povećanje je sve veća uporaba kolistina za svinje. Izvrstan primjer smanjenja prodaje polimiksina je Nizozemska koja je prodaju polimiksina smanjila za 79% od 2010. do 2015. godine. U 2010. godini prodaja polimiksina je činila svega 1,4% ukupne prodaje, dok je u 2015. prodaja iznosila 0,75%, odnosno 0,48 mg/PCU. Ukupno gledajući na razini EU, prodaja polimiksina (uglavnom kolistina od 2013. godine bez prodaje polimiksina B) je u 25 zemalja pala za 13% (EMA, 2017.).

Temeljem brojnih istraživanja ostataka kolistina u tkivima i životinjskim proizvodima u EU su određene najveće dopuštene količine rezidua (NDK) za sve životinje za hranu (EC, 2010.). Sukladno tome NDK za jetru, mišićno i masno tkivo je 150 µg/kg, za bubrež 200 µg/kg, mlijeko 50 µg/kg i jaja 300 µg/kg. Ostaci kolistina nakon oralne primjene određuju se jednako u svim navedenim tkivima, jajima i mlijeku na temelju zbroja polimiksina E₁ i E₂ HPLC metodom s fluorescentnim detektorom. Međutim, za sada nema dostupnih podataka o reziduama u jestivim tkivima nakon parenteralne primjena kolistina. Danas se u određivanju polipeptidnih antibiotika najčešće koristi metoda tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (Dotsikas i sur., 2011., Kaufmann i Widmer, 2013., Fu i sur., 2018.).

Prepoznavajući sve veću važnost kolistina u liječenju MDR Gram-negativnih infekcija u ljudi kao i potrebu smanjenja rizika širenja prenosive rezistencije na kolistin od životinjske mikrobiote do ljudi, AMEG preporuča što je moguće više smanjivanje potrošnje kolistina u veterinarskoj medicini (EMA, 2013., EMA/AMEG, 2016.).

Sažetak

Kolistin je polimiksin, polipeptidni bakteriocidni antibiotik širokog spektra

djelovanja protiv Gram-negativnih bakterija, uključujući vrste *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. i *Enterobacter* spp. Njegova antibakterijska aktivnost je prepoznata u četrdesetim godinama prošlog stoljeća. Međutim, zbog znatnih nuspojava kao što su nefrotoksičnost i neurotoksičnost, polimiksini su se rijetko koristili od 1970-ih kada su se na tržištu pojavili manje toksični aminoglikozidi i drugi antibiotici. Intravenski se kolistin primjenjivao jedino u liječenju pacijenata s infekcijom pluća Gram-negativnim bakterijama, odnosno cističnom fibrozom. Mehanizam antimikrobne aktivnosti kolistina je vezanje na lipopolisaharide i fosfolipide u vanjskoj staničnoj membrani Gram-negativnih bakterija. Oni kompetitivno istiskuju dvovalentne katione iz fosfatnih skupina membranskih lipida, što dovodi do poremećaja vanjske stanične membrane, propuštanja unutarstaničnih sadržaja i smrti bakterija. Komercijalno su dostupna dva oblika kolistina: kolistin sulfat i natrijev kolistimetat. Vezano za doziranje kolistina i danas postoji potreba za studijama optimizacije režima doziranja i učinkovitosti. Danas širom svijeta veliki problem predstavlja pojava teških infekcija Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, otpornih na većinu klasa komercijalno dostupnih antibiotika, kao i nedostatak novih antibiotika s aktivnošću protiv tih bakterija. Stoga su ponovno razmatrane terapijske mogućnosti polimiksina i došlo je do ponovne uporabe ovih polipeptidnih antibiotika, odnosno polimiksina B i kolistina. U veterinarskoj medicini, kolistin je korišten za liječenje infekcija prouzročenih *Enterobacteriaceae* na farmama životinja. Danas je jedan od pet najčešće korištenih antibiotika u životinja namijenjenih za hranu unutar EU. Potrošnja kolistina u životinja daleko je veća od one u ljudi budući da se primjenjuje uglavnom za liječenje stada ili jata. Njegova uporaba se povećala posljednjih godina djelomično i zbog razvoja otpornosti na druge klase antibiotika. Europska agencija za lijekove (EMA) je izradila izvješće o prodaji antimikrobnih veterinarskih lijekova za 30 zemalja EU za razdoblje 2010.-2015. U R. Hrvatskoj kolistin se koristi u formi kolistin sulfata u liječenju crijevnih

infekcija prouzročenih neinvazivnom *E. coli* osjetljivom na kolistin u teladi, svinja, kokoši i purana, dok se više ne koristi u liječenju crijevnih infekcija ždrijebadi niti za liječenje infekcija prouzročenih salmonelama. U 2015. u R. Hrvatskoj je zabilježena prodaja od 2,5% polimiksina u ukupnoj prodaji veterinarskih lijekova, dok je na primjer u Španjolskoj bila 8,7% ukupne prodaje. EMA je preporučila da se lijekovi koji sadrže kolistin trebaju koristiti samo za tretman drugog reda u životinja te da bi se njihova prodaja trebala svesti na minimum u svim državama članicama EU kako bi se smanjio rizik od antimikrobne rezistencije. Također, u veterinarskoj medicini nije dopuštena primjena kombinacije kolistina s drugim farmakološki djelatnim tvarima. S obzirom na postojeće podatke vjeruje se da je kolistin antibakterijski terapeutik "posljednje obrane" u 21. stoljeću protiv Gram-negativnih patogena rezistentnih na više lijekova.

Ključne riječi: kolistin, polimiksini, Gram-negativne bakterije, rezistencija na više antibiotika, višestruka rezistencija, veterinarski lijek

Literatura

1. ALOUL, A. M., H. MILLER, S. ALAPATI, P. A. STOCKTON, M. J. LEDSON and M. J. WALSHAW (2005): Renal impairment in cystic fibrosis patients due to repeated intravenous aminoglycoside use. *Pediatr. Pulmonol.* 39, 15-20.
2. BERGEN, P. J., J. LI and R. L. NATION (2011): Dosing of colistin – back to basic PK/PD. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 464-469.
3. BISWAS, S., J. M. BRUNEL, J. C. DUBUS, M. REYNAUD-GAUBERT and J. M. ROLAIN (2012): Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 917-934.
4. BRINK, A. J., J. COETZEE, C. CORCORAN, C. G. CLAY, D. HARI-MAKKAN, R. K. JACOBSON, G. A. RICHARDS, C. FELDMAN, L. NUTT, J. VAN GREUNE, J. D. DEETLEFS, K. SWART, L. DEVENISH, L. POIREL and P. NORDMANN (2013): Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* 51, 369-372.
5. CATCHPOLE, C. R., J. M. ANDREWS, N. BRENNWALD and R. WISE (1997): A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 255-260.
6. CUNNINGHAM, S., A. PRASAD, L. COLLYER, S. CARR, I. B. LYNN and C. WALLIS (2001):

- Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 84, 432-433.
7. DECOLIN, D., P. LEROY, A. NICOLAS and P. ARCHIMBAULT (1997): Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. *J. Chromatogr. Sci.* 35, 557-564.
 8. DENTON, M., K. KERR, L. MOONEY, V. KEER, A. RAJGOPAL, K. BROWNLEE, P. ARUNDEL and S. CONWAY (2002): Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr. Pulmonol.* 34, 257-261.
 9. DOTSIKAS, Y., C. K. MARKOPOULOU, J. E. KOUNDOURELLIS and Y. L. LOUKAS (2011): Validation of a novel LC-MS/MS method for the quantification of colistin A and B in human plasma. *J. Sep. Sci.* 34, 37-45.
 10. EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L15, 1-72.
 11. ECDC/EFSA/EMA (2017): ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). *EFSA J.* 15, 4872.
 12. EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* February 2018.
 13. EMA (2013): Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. EMA/755938/2012. Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf
 14. EMA (2016): Countries should reduce use of colistin in animals to decrease the risk of antimicrobial resistance Goal is to cut colistin sales by 65%. European Medicines Agency, 27 July 2016, EMA/480583/2016
 15. EMA (2017): Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. Seventh ESVAC report. European Medicines Agency, EMA/184855/2017.
 16. EMA/AMEG (2016): Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. European Medicines Agency - Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group, EMA/CVMP/CHMP/231573/2016. Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/07/WC500211080.pdf
 17. FALAGAS, M. E. and S. K. KASIAKOU (2005): Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333-1341.
 18. FALAGAS, M. E., M. RIZOS, I. A. BLIZIOTIS, K. RELLOS, S. K. KASIAKOU and A. MICHALOPOULOS (2005): Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. *BMC Infect. Dis.* 5, 1.
 19. FU, Q., X. LI, K. ZHENG, Y. KE, Y. WANG, L. WANG, F. YU and X. XIA (2018): Determination of colistin in animal tissues, egg, milk, and feed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 248, 166-172.
 20. GOUGH, M., R. E. HANCOCK and N. M. KELLY (1996): Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* 64, 4922-4927.
 21. GROISMAN, E. A., J. KAYSER and F. C. SONCINI (1997): Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J. Bacteriol.* 179, 7040-7045.
 22. GUNDERSON, B. W., K. H. IBRAHIM, L. B. HOVDE, T. L. FROMM, M. D. REED and J. C. ROTSCHAFER (2003): Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 905-909.
 23. HOGARDT, M., S. SCHMOLDT, M. GOTZFRIED, K. ADLER and J. HESEMANN (2004): Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1057-1061.
 24. KASIAKOU, S. K., A. MICHALOPOULOS, E. S. SOTERIADES, G. SAMONIS, G. J. SERMAIDES and M. E. FALAGAS (2005): Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3136-3146.
 25. KAUFMANN, A. and M. WIDMER (2013): Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 797, 81-88.
 26. KOCH-WESER, J., V. W. SIDEL, E. B. FEDERMAN, P. KANAREK, D. C. FINER and A.E. EATON (1970): Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann. Intern. Med.* 72, 857-868.
 27. KUNIN, C. M. and A. BUGG (1971): Binding of polymyxin antibiotics to tissues: the major determinant of distribution and persistence in the body. *J. Infect. Dis.* 124, 394-400.
 28. LI, J., R. W. MILNE, R. L. NATION, J. D. TURNIDGE, T. C. SMEATON and K. COULTHARD (2003a): Use

- of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1766-1770.
29. LI, J., K. COULTHARD, R. MILNE, R. L. NATION, S. CONWAY, D. PECKHAM, C. ETHERINGTON and J. TURNIDGE (2003b): Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 987-992.
30. LI, J., R. W. MILNE, R. L. NATION, J. D. TURNIDGE and K. COULTHARD (2003c): Stability of colistin and colistin methanesulphonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1364-1370.
31. LI, J., R. W. MILNE, R. L. NATION, J. D. TURNIDGE, T. C. SMEATON and K. COULTHARD (2004): Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 837-840.
32. LIM, L. M., N. LY, D. ANDERSON, J. C. YANG, L. MACANDER, A. JARKOWSKI, A. FORREST, J. B. BULITTA, B. T. TSUJI (2010): Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy* 30, 1279-1291.
33. MARKOU, N., H. APOSTOLAKOS, C. KOUMOUDIYOU, M. ATHANASIOU, A. KOUTSOUKOU, I. ALAMANOS and L. GREGORAKOS (2003): Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant gram-negative bacilli in critically ill patients. *Crit. Care* 7, R78-83.
34. MICHALOPOULOS, A., S. TSIODRAS, K. RELLOS, S. MENTZELOPOULOS and M. E. FALAGAS (2005): Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 115-121.
35. MICHALOPOULOS, A. S. and D. C. KARATZA (2010): Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* 8, 1009-1017.
36. MINISTRARSTVO POLJOPRIVREDE (2018): <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=140>
37. MOORE, R. A. and R. E. HANCOCK (1986): Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 923-926.
38. PULCINI, C., K. BUSH, W. A. CRAIG, N. FRIMODT-MOLLER, M. L. GRAYSON, J. W. MOUTON, J. TURNIDGE, S. HARBARTH, I. C. GYSSENS (2012): Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin. Infect. Dis.* 54, 268-274.
39. RASTOGI, N., M. C. POTAR, J. G. HENROTTE, G. FRANCK and H. L. DAVID (1988): Further studies on colistin (polymyxin E)-induced cell leakage in mycobacteria: Mg⁺⁺ efflux in *Mycobacterium avium* and its effects on drug-susceptibility. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 268, 251-258.
40. REED, M. D., R. C. STERN, M. A. O'RIORDAN and J. L. BLUMER (2001): The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pharmacol.* 41, 645-654.
41. ROBERTS, K. D., M. A. K. AZAD, J. WANG, A. S. HORNE, P. E. THOMPSON, R. L. NATION, T. VELKOV and J. LI (2015): Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin b and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *ACS Infect. Dis.* 1, 568-575.
42. SPAPEN, H., R. JACOBS, V. VAN GORP, J. TROUBLEYN and P. M. HONORÉ (2011): Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann. Intens. Care* 1, 14.
43. TASCINI, C., S. FERRANTI, F. MESSINA and F. MENICHETTI (2000): In vitro and in vivo synergistic activity of colistin, rifampin, and amikacin against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 690-691.
44. TASCINI, C., G. GEMIGNANI, S. FERRANTI, E. TAGLIAFERRI, A. LEONILDI, A. LUCARINI and F. MENICHETTI (2004): Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Chemother.* 16, 282-287.
45. WALSH, T. R. and M. A. TOLEMAN (2012): The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1-3.
46. WERTHEIM, H. K. VAN NGUYEN, G.L. HARA, H. GELBAND, R. LAXMINARAYAN, J. MOUTON and O. CARS (2013): Global survey of polymyxin use: A call for international guidelines. *J. Global Antimicrob. Res.* 1, 131-134.
47. ZIV, G., J. F. NOUWS and C. A. VAN GINNEKEN (1982): The pharmacokinetics and tissue levels of polymyxin B, colistin and gentamicin in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 5, 45-58.

Colistin, a last defence polypeptide antibiotic against invasive Gram-negative bacteria

Nina BILANDŽIĆ, PhD, Scientific Advisor, Ivana VARENINA, PhD, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, BSc, Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ, BSc, Ines VARGA, MSc, Svjetlana TERZIĆ, PhD, DVM, Assistant Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Colistin is a polymyxin, a bactericidal antibiotic polypeptide with wide spectrum action against Gram-negative bacteria including *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. Its antibacterial activity was already recognized in the 1940s. However, due to significant side effects such as nephrotoxicity and neurotoxicity, polymyxins have seldom been used since the 1970s, when less toxic aminoglycosides and other antibiotics were made available on the market. Colistin was only used intravenously in the treatment of patients with lung infections with Gram-negative bacteria or cystic fibrosis. The mechanism of antimicrobial activity of colistin is that it binds to the lipopolysaccharides and phospholipids in the outer cell membrane of Gram-negative bacteria. They competitively expel bivalent cations from the phosphate groups of membrane lipids, leading to external cell membrane disorders, leakage of intracellular content, and bacterial death. Two forms of colistin, colistin sulphate and colistimethate sodium are commercially available. With regard to colistin dosage, dosing and efficacy dosing optimization studies are still required. The occurrence of severe infections with Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, is a major problem worldwide, as they are resistant to most classes of commercially available antibiotics, and new antibiotics with antibacterial activity against these bacteria are lacking. Therefore, the therapeutic possibilities of polymyxins

were re-examined and the reuse of these polypeptide antibiotics, *i.e.* polymyxin B and colistin, considered. In veterinary medicine, colistin has been used for the treatment of infections caused by *Enterobacteriaceae* in farm animals. Today, it is one of the five most commonly used antibiotics in food-producing animals within the EU. Consumption of colistin in animals is far greater than in humans. Its use has increased in recent years partly due to the development of resistance to other classes of antibiotics. The European Medicines Agency (EMA) presented a report on the sale of antimicrobial veterinary drugs using data from 30 EU countries for the period 2010–2015. In Croatia, colistin is used in the form of colistin sulphate in the treatment of intestinal infections caused by non-invasive, colistin-sensitive *E. coli* in cattle, pigs, hens and sheep. In 2015, sales of polymyxins accounted for 2.5% of the total sales of veterinary drugs in Croatia, while in Spain, sales accounted for 8.7% of the total sales. The EMA has recommended that colistin-containing medicines should only be used for second-line treatment in animals and that their sales should be minimized in all EU Member States in order to reduce the risk of antimicrobial resistance. Given the existing data, it is believed that colistin is a “last defence” antibacterial therapeutic against Gram-negative pathogens resistant to multiple drugs in the 21st century.

Key words: colistin, polymyxins, Gram-negative bacteria, multidrug-resistance, veterinary drug