



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Snežana B. Mladenović-Antić

**DETEKCIJA MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA
KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA I
VRSTE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2018.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Snežana B. Mladenović-Antić

**DETECTION OF CARBAPENEM RESISTANCE
MECHANISMS IN ENTEROBACTERIA AND
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2018.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Dr sci. med., Marina Dinić, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Nišu

Naslov: DETEKCIJA MEHANIZAMA REZISTENCIJE NA KARBAPENEME KOD ENTEROBAKTERIJA I VRSTE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Rezime: **Ciljevi istraživanja:** kod izolata enterobakterija i vrste *Pseudomonas aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) dokazati postojanje gena koji kodiraju karbapenemaze; primenom fenotipskih metoda utvrditi najčešće mehanizme rezistencije na karbapeneme. Evaluacijom fenotipskih metoda u odnosu na PCR kao referentnu metodu, dokazati da fenotipske metode predstavljaju pouzdan test za detekciju karbapenemaza i utvrditi najčešće fenotipove rezistencije sojeva koji su rezistentni na karbapeneme. **Metode:** Kod 107 izolata vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* i 75 izolata vrste *Pseudomonas aeruginosa* izvršeno je ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove disk-difuzionom metodom po Kirby-Baueru, prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI). Minimalna inhibitorna koncentracija za antimikrobne lekove određivana je automatizovanim sistemom- Vitek2 sistemom. Metodom PCR i pomoću fenotipskih testova za detekciju karbapenemaza testirano je 56 izolata enterobakterija i 14 izolata vrste *P. aeruginosa*. Validnost fenotipskih testova i izražena kroz senzitivnost, specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost (PPV i NPV) u poređenju sa PCR metodom. Podaci su prikazani po pravilima deskriptivne statistike. **Rezultati:** Metodom PCR kod enterobakterija dokazani su geni za produkciju karbapenemaza: 24 *bla_{NDM}*, 16 *bla_{OXA-48}*, 10 *bla_{NDM/OXA-48}*. Kod dva izolata dokazani su *bla_{NDM/OXA-48/KPC}* i *bla_{KPC/NDM}* geni. Nije dokazano prisustvo *bla_{VIM}* gena. Kod 6 izolata vrste *Pseudomonas aeruginosa* dokazan je *bla_{NDM}* gen. Od primenjenih fenotipskih testova visoke vrednosti specifičnosti (veće od 95%) pokazali su modifikovani Hodge test, CARBA NP test, kombinovani disk test i test sinergizma, dok je visoku senzitivnost (veća od 95%) pokazao chromID CARBA agar. Najčešći fenotipovi rezistencije kod enterobakterija bili su izolati rezistentni na sve testirane antibiotike osim na kolistin i tigeciklin, a kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* na kolistin i piperacilin-tazobaktam. **Zaključci:** Na osnovu rezultata senzitivnosti, specifičnosti, PPV i NPV, metode fenotipskog dokazivanja produkcije karbapenemaza predstavljaju pouzdan test za detekciju ovog mehanizma rezistencije i kod enterobakterija i kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*.

Naučna oblast: Medicina
Naučna disciplina: Mikrobiologija

Ključne reči: Rezistencija na karbapeneme, genotipska detekcija, fenotipska detekcija, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*

UDK:

CERIF klasifikacija: B230

Тип лиценце Креативне заједнице: CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Dr sci. med., Marina Dinić, Full-professor, Faculty of medicine, University of Niš

Title: DETECTION OF CARBAPENEM RESISTANCE MECHANISMS IN ENTEROBACTERIA AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Abstract: **The aims of the research:** to examine the presence of genes which encode carbapenemases among enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced sensitivity to carbapenems by using the polymerase chain reaction (PCR); to determine the most common mechanisms of resistance to carbapenems using phenotypic methods. To evaluate the phenotypic methods in relation to PCR as a reference method, and determine the most common phenotypes.

Methods: 107 isolates from the Enterobacteriaceae family and 75 isolates of the species *Pseudomonas aeruginosa* were examined. Antimicrobial susceptibility was determined by the Kirby-Bauer disc-diffusion method and the automated Vitek2 system according to the recommendations of the Institute for Clinical and Laboratory Standards (CLSI). Using PCR and phenotypic methods, 56 enterobacterial isolates and 14 isolates of *P. aeruginosa* were tested. The results of the phenotypic tests were validated by a comparison with genotypic data and expressed through sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value (PPV and NPV). **Results:** Carbapenemase genes were detected by the PCR method in 52 *Enterobacteriaceae* isolates: 24 *bla*_{NDM}, 16 *bla*_{OXA-48}, 10 *bla*_{NDM}/*bla*_{OXA-48}, one isolate *bla*_{NDM}/*bla*_{OXA-48}/*bla*_{KPC}, one isolate *bla*_{KPC}/*bla*_{NDM} and six *bla*_{NDM} genes in *Pseudomonas aeruginosa*. All of the tested isolates were negative for the *bla*_{VIM} genes.

Among the applied phenotypic tests, high specificity (in excess of 95%) was found for the modified Hodge test, the CARBA NP test, combined disc test and synergistic test, while high sensitivity (greater than 95%) was determined for the chromID CARBA agar. The most common phenotypes of resistance in enterobacteria were isolates resistant to all the tested antibiotics except for colistin and tigecycline, and in the case of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin and piperacillin-tazobactam.

Conclusions: Based on the results of sensitivity, specificity, PPV and NPV, the phenotypic methods for the detection of carbapenemase production represent reliable tests for the detection of this resistance mechanism both in enterobacteria and in *Pseudomonas aeruginosa*.

Scientific Field: Medicine

Scientific Discipline: Microbiology

Key Words: Carbapenem resistance, genotypic detection, phenotypic detection, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*

UDC:

CERIF Classification: B230

Creative Commons License Type: CC BY-NC-ND

SADRŽAJ

1 UVOD	1
1.1 Klinički značaj rezistencije Gram-negativnih bacila na karbapeneme.....	1
1.1.1 Klinički značaj bakterijskih vrsta familije <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.1.2 Prevalenca rezistencije na karbapeneme bakterijskih vrsta familije <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.1.3 Klinički značaj vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.4 Prevalenca rezistencije na karbapeneme kod vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2 Mehanizam delovanja karbapenema	5
1.2.1. Poreklo rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija i vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.3 Mehanizam rezistencije Gram-negativnih bacila na karbapeneme	7
1.3.1 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod Gram- negativnih bacila (karbapenemaze).....	8
1.3.1.1 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod enterobakterija	15
1.3.1.2 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.3.2 Rezistencija Gram- negativnih bacila na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama.....	17
1.3.2.1 Rezistencija enterobakterija na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama	17
1.3.2.2 Rezistencija vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama	19
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3 NAUČNO-RADNE HIPOTEZE	23
4 MATERIJAL I METODE	24
5. REZULTATI	38
5.1. Analiza izolata familije <i>Enterobacteriaceae</i> genotipskim i fenotipskim metodama.....	38
5.1.1 Rezultati ispitivanja osetljivosti enterobakterija na antimikrobne lekove	38
5.1.1.1 Osetljivost enterobakterija na antimikrobne lekove određena disk-difuzionom metodom.....	38
5.1.1.2 Osetljivost enterobakterija na antimikrobne lekove određena minimalnom inhibitornom koncentracijom Vitek 2 sistemom	39
5.1.2 Fenotipovi rezistencije kod enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme	41
5.1.3. Rezultati genotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod enterobakterija....	44
5.1.3.1. Zastupljenost gena koji kodiraju sintezu karbapenemaza PCR metodom	44
5.1.3.2 Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza pozitivnih izolata enterobakterija.....	55
5.1.3.3. Osetljivost na ostale ispitivane antimikrobne lekove karbapenemaza pozitivnih izolata enterobakterija.....	57
5.1.3.4. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza negativnih izolata enterobakterija	58
5.1.3.5. Osetljivost na ostale ispitivane antimikrobne lekove karbapenemaza negativnih izolata enterobakterija.....	58
5.1.4. Rezultati fenotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod enterobakterija	59

5.1.4.1 Zastupljenost karbapenemaza određena Vitek 2 AES sistemom	59
5.1.4.2 Rezultati modifikovanog Hodge-testa za detekciju produkcije karbapenemaza	62
5.1.4.3. Rezultati fenotipskih testovi sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza	66
5.1.4.4. Rezultati kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza	75
5.1.4.5. Rezultati fenotipske detekcije produkcije β -laktamaza proširenog spektra duplim disk-difuzionim testom	81
5.1.4.6 Rezultati fenotipske detekcije produkcije metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom	83
5.1.4.7. Rezultati kolorimetrijskog testa za detekciju karbapenemaza	86
5.1.4.8. Rezultati fenotipske detekcije produkcije karbapenemaza određeni hromogenim podlogama	87
5.2. Analiza izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> genotipskim i fenotipskim metodama	89
5.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antimikrobne lekove	89
5.2.1.1. Osetljivost na antimikrobne lekove vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> određena disk-difuzionom metodom	89
5.2.1.2 Osetljivost na antimikrobne lekove vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> određena minimalnom inhibitory koncentracijom Vitek 2 sistemom	90
5.2.2. Fenotipovi rezistencije kod vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme	91
5.2.3. Rezultati genotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93
5.2.3.1. Zastupljenost gena koji kodiraju sintezu karbapenemaza PCR metodom	94
5.2.3.2 Osetljivost ispitivanih izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na karbapeneme Vitek2 sistemom	97
5.2.4 Rezultati fenotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98
5.2.4.1 Zastupljenost karbapenemaza određena Vitek 2 AES sistemom	98
5.2.4.2. Rezultati fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza	99
5.2.4.3. Zastupljenost metalo-beta laktamaza određena fenotipskim ispitivanjem diskom aztreonama	100
5.2.4.4. Rezultati kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza	100
5.2.4.5. Rezultati fenotipske detekcije produkcije metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom	101
5.2.4.6. Rezultati kolorimetrijskog testa za detekciju karbapenemaza	102
5.2.4.7. Rezultati fenotipske detekcije produkcije karbapenemaza određeni hromogenim podlogama	103
6 DISKUSIJA	104
7 ZAKLJUČCI	141
8 LITERATURA	145

LISTA SKRAĆENICA:

ACQ- acquired cephalosporinase- stečena cefalosporinaza
AES- Advanced Expert System- napredni ekspertski sistem
AIM-1- Adelaide imipenemase -Adelaid imipenemaza
AK- amikacin
AMC- amoksisicilin- klavulanska kiselina
AML- antimikrobni lekovi
AMP- ampicilin
ATM - aztreonam
CAESAR- Central Asian and Eastern European Surveillance of antimicrobial resistance -Praćenje bakterijske rezistencije u Centralnoj Aziji i istočnoj Evropi
CAZ- ceftazidim
CDT - kombinovani disk test
CIP- ciprofloksacin
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute- Institut za kliničke i laboratorijske standarde
CP- carbapenemase- karbapenemaza
CP- carbapenemase -metallo- or OXA- karbapenemaza- metalo ili oksacilinaza
CRE- carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*-enterobakterije rezistentne na karbapeneme
CS- kolistin
CTX- cefotaksim
DDT - dupli disk- difuzioni test
DIM - Dutch imipenemase- Holandska imipenemaza
DPA - dipicolinic acid-dipikolonična kiselina
EARS-Net- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network-Evropska mreža za praćenje bakterijske rezistencije
EDTA - Etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina
ESBL - Extended-spectrum β -lactamase- β -laktamaza proširenog spektra
ESCMID- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases- Evropsko udruženje za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti
ETP- ertapenem
EUCAST- European Committee on antimicrobial susceptibility testing- Evropski komitet za testiranje osetljivosti na antimikrobne lekove
FEP- cefepim
FOS- fosfomicin
GES - Guiana extended-spectrum β -lactamase- Gvajana β -laktamaza proširenog spektra
GIM - German imipenemase- Nemačka imipenemaza
GM- gentamicin
HCAP- healthcare-associated pneumonia- pneumonija povezana sa zdravstvenom negom
HL CASE- high-level cephalosporinase- cefalosporinaza visokog nivoa
IDSA- The Infectious Diseases Society of America-Američko udruženje za infektivne bolesti
IMP – Imipenemase- imipenemaza
IMP- imipenem
IMP-1- active on imipenem- deluju na imipenem
IMPER- impermeability- nepropustljivost
IP/IPI - Imipenem/imipenem+EDTA (etilen- diamino- tetrasirćetna kiselina)
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-karbapenemaze vrste *Klebsiella pneumoniae*
MBL - Metallo- β lactamase –metalo- β laktamaza

MDR- multidrugresistant- multirezistentan
MEM- meropenem
MHT- modifikovani Hodge-test
MIC - minimalna inhibitorna koncentracija
MLST- multilocus sequence typing- višelokusno sekvencijsko tipiziranje
MRP BO- meropenem-boronična kiselina
MRP CX-meropenem- kloksacilin
MRPBO – Meropenem- fenilboronična kiselina
MRP-DP- meropenem- dipikolonična kiselina
MRP- meropenem
NAG- N-acetil glukozamin
NAM- N-acetil- muraminska kiselina
NDM - New Delhi metallo- β -lactamase- NjuDelhi metalo- β -laktamaza
NMC-A- imipenemase/non-metallo-carbapenemase A-imipenemaza-ne-metallokarbapenemaza A
NOR- norfloksacin
NPV- negativna prediktivna vrednost
OXAs – Oxacillinases- oksacilinaza
PBO - Phenylboronic acid- fenilboronična kiselina
PBPs- penicillin-binding proteins- penicilin vezujući proteini
PCR - Polymerase chain reaction- reakcija lančane polimerizacije
PDR- pandrug-resistant- panrezistentan
PPV- pozitivna prediktivna vrednost
RND- resistance- nodulation- division
SIM - Seul imipenemase- Seul imipenemaza
SPM - Sao Paolo imipenemase- Sao Paolo imipenemaza
TGC- tigeciklin
TMB-1- Tripoli metallo- β -lactamase-1-Tripoli metalo- β laktamaza
TS- trimetoprim- sulfametoksazol
TSB- triptikaza-soja bujon
TZP- piperacilin-tazobaktam
VAP- ventilator associated pneumonia- pneumonija povezana sa asistiranom ventilacijom
VIM - Verona imipenemase-Verona imipenemaza
XDR- extended drug resistant- prošireno rezistentan

1 UVOD

1.1 Klinički značaj rezistencije Gram-negativnih bacila na karbapeneme

1.1.1 Klinički značaj bakterijskih vrsta porodice *Enterobacteriaceae*

Enterobakterije, Gram-negativni bacili, su normalni stanovnici crevne flore ljudi, ali i izazivači velikog broja infekcija kod ambulantno lečenih i hospitalizovanih bolesnika. Najčešći uzročnici su *Escherichia coli* (*E.coli*) i *Klebsiella spp.*, ali i mnogi drugi pripadnici porodice enterobakterija mogu izazvati širok spektar infekcija kod ljudi kao što su infekcije urinarnog trakta i rana, apsces jetre, nekrotizujući fasciitis, meningitis i sepsa. Široka rasprostranjenost pripadnika ove porodice u mikroflori ljudi i životinja kao i njihovo prisustvo u spoljnoj sredini, hrani i vodi omogućava brzo širenje u ljudskoj populaciji. Pored toga, enterobakterije poseduju sposobnost preuzimanja genetskog materijala horizontalnim genetskim transferom, najčešće plazmidima ili transpozonomima.^{1, 2, 3} Ove odlike omogućavaju pojavu multirezistentnih sojeva (engl.- *multidrug-resistant*- MDR) i njihovo dalje širenje, što je od izuzetnog značaja sa terapijskog stanovišta. Od 2000. godine beleži se porast broja sojeva koji produkuju β -laktamaze širokog spektra delovanja (engl.-*extended spectrum β -lactamases*, ESBL) širom sveta.⁴ Zbog rezistencije na skoro sve β -laktamske antimikrobne lekove (AML), infekcije izazvane ESBL pozitivnim sojevima najčešće su tretirane karbapenemima. To se naročito odnosi na terapiju najtežih bolničkih infekcija u jedinicama intenzivne nege, na hirurškim odeljenjima i kod transplantiranih pacijenata. Povećana upotreba karbapenema dovela je do pojave rezistencije enterobakterija i na ovu klasu β -laktamskih antibiotika.⁵

Enterobakterije rezistentne na karbapeneme (engl.- *carbapenem resistant Enterobacteriaceae*- CRE) u bolničkim sredinama izazivaju infekcije koje mogu zahvatiti različite organe. U većini studija CRE su najčešće uzročnici urinarnih infekcija.^{6, 7} Najvećem riziku izloženi su pacijenti sa trajnim urinarnim kateterom.⁸ Infekcija izazvana ovim bakterijama opisana je i kod transplantacije organa kao faktora rizika.⁹

Značajne infekcije izazvane enterobakterijama rezistentnim na karbapeneme su i pneumonije¹⁰ empijemi pleure,¹¹ kao i pneumonija povezana s mehaničkom ventilacijom (engl.- *ventilator associated pneumonia*, VAP).¹² Takođe, smrtnost je veća nego kod infekcija izazvanih

enterobakterijama koje su osjetljive na karbapeneme i iznosi 72% kod sepse i 22% kod pacijenata sa infekcijama drugih organa.¹³ Sepsa je jedna od najozbiljnijih infekcija koju izazivaju enterobakterije. Sepsa izazvana Gram-negativnim bacilima najčešće je povezana sa visokom smrtnošću,¹⁴ koja je značajno veća ukoliko su uzročnici enterobakterije rezistentne na karbapeneme u odnosu na enterobakterije sa većom osjetljivošću na AML.^{15, 16, 17}

Mnoge studije ukazuju na vrlo tešku kliničku sliku kod nekrotizujućeg fasciitisa i septičkog artritisa,^{18, 19} kao i meningitisa, kada su ova oboljenja uzrokovana enterobakterijama rezistentnim na karbapeneme.²⁰ Takođe, mnogi autori ukazuju na značaj i ozbiljnost apscesa jetre,²¹ infekcije kože i mekih tkiva.^{22, 23}

Poseban problem predstavljaju pacijenti koji posle bolničkog lečenja odlaze na kućno lečenje ili se podvrgavaju fizikalnim procedurama, ako su još uvek kolonizovani ovim bakterijama.²⁴ Veliki rizik od fekalnog nosilaštva i asimptomatske infekcije postoje u ustanovama za produženu medicinsku negu.²⁵ Enterobakterije rezistentne na karbapeneme širom sveta se sve češće javljaju i kao uzročnici vanbolničkih infekcija.²⁶ Mogu izazvati i epidemije u bolničkim sredinama.²⁷ Infekcije CRE uslovljavaju produžen boravak u bolnici i velike troškove lečenja.^{28, 29}

1.1.2 Prevalenca rezistencije na karbapeneme bakterijskih vrsta familije *Enterobacteriaceae*

Rezistencija na antibiotike kod enterobakterija je u stalnom porastu- prema Američkom udruženju infektologa (engl.- *The Infectious Diseases Society of America- IDSA*) je jedna od najvećih pretnji po ljudsko zdravlje.³⁰ Pojava rezistencije na karbapeneme kod kliničkih izolata enterobakterija je takođe u porastu širom sveta, ali sa velikim regionalnim varijacijama.^{31, 32, 33}

Značajno povećanje rezistencije na karbapeneme zabeleženo je u Grčkoj, na Kipru, u Mađarskoj i Italiji.³⁴ Tretman multirezistentnih bakterija predstavlja sve veći klinički problem.³⁵ U izveštaju studije praćenja bakterijske rezistencije u Centralnoj Aziji i istočnoj Evropi (engl.- *Central Asian and Eastern European Surveillance of antimicrobial resistance- CAESAR*) za 2014. godinu, invazivni izolati *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) pokazuju rezistenciju na karbapeneme od 34%, dok je kod *E. coli* rezistencija 1,0%. Rezistencija na cefalosporine treće generacije kod *K.pneumoniae* iznosi 89% a kod *E. coli* 33%.³⁶ Prema izveštaju Evropske mreže za praćenje bakterijske rezistencije (engl.- *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network- EARS-Net*) za 2015. godinu, rezistencija na karbapeneme vrste *E.coli* u većini zemalja iznosi 0,1%, dok 1% prelazi jedino u Rumuniji (1.9%) i Grčkoj (1.2%), bez značajnog trenda porasta. Kod vrste *K.pneumoniae* rezistencija na karbapeneme pokazuje signifikantan porast u periodu 2012.-2015.

godine, od 6.2% do 8.1%. Najveći porast beleži se u Hrvatskoj, Portugaliji, Rumuniji i Španiji. Na nacionalnom nivou, procenat rezistencije na karbapeneme kreće se od 0% (Danska, Estonija, Finska, Island, Litvanija, Latvija, Luksemburg i Švedska) do 61.9% (Grčka).³⁷

1.1.3 Klinički značaj vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P.aeruginosa*) je oportunistička Gram-negativna nefermentativna bakterija koja je raširena u prirodi, posebno u vlažnim sredinama. *P.aeruginosa* je jedan od najčešće izolovanih bolničkih patogena.^{38, 39} Opstanak u bolničkim sredinama omogućava mu velika otpornost na uslove spoljašnje sredine - više od mesec dana živi na suvom podu, na suvom filter papiru 150 dana, u vodi više od 300 dana.⁴⁰ Mnogobrojni faktori omogućavaju prilagođavanje uslovima sredine i dugotrajno preživljavanje u nepovoljnim uslovima. Jedan od njih je i sastav i veličina genoma ove bakterije. Genom *P.aeruginosa* PAO1 sadrži 6,3 miliona parova baza i sastoji se od preko 5500 gena. Ovaj genom za trećinu je veći od genoma vrste *E. coli* i dvostruko veći od genoma vrste *Staphylococcus aureus*.⁴¹ Karakteristike genoma vrste *P.aeruginosa* su osim veličine i veliki broj regulatornih gena i gena koji utiču na pojavu različitih mehanizama rezistencije na antimikrobne lekove i dezinficijense. Njegova adaptabilnost takođe je omogućena osobinom stvaranja biofilma,⁴² produkcije kapsule⁴³ i regulacijom propustljivosti spoljašnje membrane.⁴⁴ Ove osobine omogućavaju mu prisustvo i preživljavanje u tečnostima za dijalizu, sapunima i dezinficijensima u bolnicama, kao i kolonizaciju površine medicinskih instrumenata (bronhoskopi, venski i respiratorni kateteri).⁴⁵ *P.aeruginosa* je uzročnik različitih infekcija u bolničkim sredinama, kao što su infekcije urinarnog trakta, kože i mekih tkiva i respiratornog trakta.⁴⁶ Nacionalna studija o prevalenci hospitalnih infekcija iz 2011. godine u Srbiji iznosi podatak da je 13,3% hospitalnih infekcija uzrokovano vrstom *P.aeruginosa*.⁴⁷

Respiratorni, urinarni i gastrointestinalni trakt hospitalizovanih pacijenata mogu biti kolonizovani, posebno kod prisustva katetera i kod pacijenata na veštačkoj ventilaciji.⁴⁸

Kod osoba s normalnim imunološkim odgovorom ne postoji veliki rizik od infekcije ovim patogenom. Najvećem riziku od invazivnih infekcija izloženi su pacijenti sa oslabljenim imunim odgovorom, posebno kod neutropenija.⁴⁹ Riziku su izloženi i pacijenti na mehaničkoj ventilaciji u jedinicama intenzivne nege. Kod njih je vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta pneumonija povezana s mehaničkom ventilacijom gde se smrtnost kreće oko 40%. *P.aeruginosa* uzrokuje i akutne infekcije kod pacijenata obolelih od cistične fibroze i drugih hroničnih respiratornih bolesti, a izaziva i pneumonije povezane sa medicinskom negom, (engl. - *healthcare-associated pneumonia*,

HCAP) kao što je hospitalizacija u poslednjih 12 meseci, rehabilitacija, boravak u staračkom domu.⁵⁰ Kod hospitalizovanih pacijenata može izazvati lokalizovane infekcije hirurških rana i opekotina^{51, 52, 53, 54}

Kao i CRE, može izazvati epidemije u bolničkim sredinama.³⁹ Bakteriemija se najčešće javlja kod pacijenata na veštačkoj ventilaciji sa pneumonijom, kod infekcija rana ili opekotina, urinarnih infekcija i kod imunokompromitovanih pacijenata.⁵⁵ *P.aeruginosa* ređe uzrokuje meningitis nakon lumbalne punkcije ili neurohirurških operacija i endokarditis nakon operacije na srcu. Kod bolesnika s dijabetesom uzrokuje invazivnu upalu spoljašnjeg ušnog kanala.⁵⁶ Visoka stopa smrtnosti (10–60%) koja prati infekcije uzrokovane vrstom *P.aeruginosa* posledica je kombinacije oslabljenog imunološkog odgovora domaćina, faktora virulencije bakterije i postojanja urođenih i stečenih mehanizama rezistencije na AML.^{57, 58, 59}

1.1.4 Prevalenca rezistencije na karbapeneme kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Pravovremena i odgovarajuća antimikrobna terapija je jedan od najvažnijih činilaca u lečenju infekcija uzrokovanih vrstom *P.aeruginosa*. Urođeni mehanizmi rezistencije ove bakterije na veliki broj AML sužavaju terapijski izbor na antipseudomonasne peniciline (piperacilin, karbenicilin), cefalosporine III i IV generacije (ceftazidim, cefepim), karbapeneme (imipenem, meropenem), aminoglikozide (amikacin, gentamicin, tobramicin), monobaktam aztreonam i fluorohinolone (ciprofloksacin, norfloksacin, levofloksacin).^{60, 61} Aminoglikozidi i fluorohinoloni ne preporučuju se u monoterapiji, nego u kombinaciji sa drugim AML za lečenje teških infekcija.⁶²

Poslednjih godina, beleži se porast broja rezistentnih sojeva na više AML. Nastanak MDR sojeva kod hospitalizovanih pacijenata predstavlja ozbiljan terapijski problem i povećava mortalitet vezan za hospitalne infekcije.⁵⁸ Na povećani mortalitet utiču i komorbiditet i invazivne procedure.⁵⁵ Infekcije MDR sojevima po pravilu su ozbiljne i teške za lečenje jer terapijske opcije isključuju veliki broj strukturno i funkcionalno različitih AML prema kojima ovi sojevi poseduju urođenu ili stečenu rezistenciju. Podaci sa našeg područja ukazuju na porast rezistencije i udela multirezistentnih sojeva. Na našem području, 2014. godine procenat MDR sojeva iznosio je 34,7%.⁶³ Multirezistentni (MDR) sojevi karakterišu se visokim procentom rezistencije na veliki broj antipseudomonasnih AML.⁶⁴ Procenat MDR izolata u Evropi kreće se od 0% (Estonija i Island) do 59.6 % (Rumunija). Značajno smanjenje MDR sojeva beleži se u Austriji i Francuskoj, a povećanje u Mađarskoj i Sloveniji.⁶⁵

Za terapiju infekcija izazvanih MDR sojevima *P.aeruginosa* najefikasniji su karbapenemi. Koriste se za tretman najtežih infekcija, kao terapijska opcija kod bakterija rezistentnih na AML prvog izbora. Porast MDR sojeva uslovio je i povećanu upotrebu karbapenema, što je dovelo do porasta rezistencije na ove AML. Ova pojava uslovljena je ne samo prekomernom već i neodgovarajućom upotrebom antibiotika, posebno širokog spektra u bolničkoj sredini, kao i prenosom gena rezistencije lokalizovanih na mobilnim genetskim elementima.⁶⁶

Prema podacima godišnjeg izveštaja EARSS objavljenim za 2015. godinu, 17,8% izolata rezistentno je na karbapeneme, sa velikim regionalnim razlikama- procenat izolata rezistentnih na karbapeneme u Evropi kreće se od 0% (Island) do 66.3% (Rumunija). Najveći procenat rezistencije na karbapeneme kod *P.aeruginosa* u jugoistočnom delu Evrope - Grčkoj, Hrvatskoj, Slovačkoj i Rumuniji (40.4%, 38.5%, 51.9%, 66.3%, datim redom). Trend porasta rezistencije beleži se u Hrvatskoj, Mađarskoj, Poljskoj i Španiji.³⁷ Landman i saradnici nalaze više od 25% izolata *P.aeruginosa* rezistentnih na karbapeneme.⁶⁷ Podaci sa našeg područja iz 2007. godine ukazuju na 9,7% izolata rezistentnih na imipenem i 11,3% rezistentnih na meropenem.⁶⁸

1.2 Mehanizam delovanja karbapenema

Karbapenemi su β -laktamski antibiotici koji imaju najširi spektar od svih predstavnika ove grupe. Lako prolaze ćelijsku membranu i deluju na mnoge Gram-pozitivne, Gram-negativne i anaerobne bakterije.^{69, 70}

Karbapenemi inhibiraju sintezu peptidoglikana u ćelijskom zidu bakterije. Završni korak u sintezi peptidoglikana je transpeptidacija, posredovana enzimima transpeptidazama, poznatim i kao penicilin vezujući proteini (engl.-*penicillin-binding proteins*- PBPs). Ciljno mesto dejstva karbapenema su ovi enzimi, koji imaju različit afinitet za vezivanje β -laktamskih AML, i različiti su za pojedine bakterijske vrste.

Beta-laktamski antibiotik po strukturi liči na D-alanil-D-alanin, terminalni aminokiselinski ostatak na prekursoru N-acetil muraminska kiselina (NAM)/N-acetil glukozamin (NAG) peptidne subjediniice u nastajućem peptidoglikanskom sloju. Ta sličnost u građi uslovljava vezivanje β -laktamskih antibiotika za aktivno mesto na PBP (Ser403 ostatak). Ovaj proces ireverzibilno onemogućava dalju sintezu ćelijskog zida, sprečavanjem stvaranja poprečnih transpeptidnih veza u peptidoglikanu. U normalnim okolnostima, nagomilavanje peptidoglikanskih prekursora signal je za početak dejstva hidrolaza (autolizina). Inhibicija vezivanjem β -laktamskih antibiotika nagomilava

peptidoglikanske prekursore, i počinje razgradnja postojećeg peptidoglikana bez produkcije novog što dodatno doprinosi razgradnji ćelijskog zida i dovodi do lize bakterijske ćelije.^{71,72}

Karbapenemi su vrlo često jedina terapijska opcija za lečenje infekcija uzrokovanih multirezistentnim gram-negativnim bakterijama.⁷³ Ovi AML su izrazito stabilni prema β -laktamazama. Otporni su na β -laktamaze proširenog spektra delovanja iz porodice TEM, SHV i CTX-M, plazmidske AmpC β -laktamaze (FOX, MOX, CMY, MIR, DHA) i hromozomske cefalosporinaze Gram-negativnih bakterija. Stablnost karbapenema prema tim enzimima nije potpuna. Dejstvo enzima ogleda se u sporoj hidrolizi i dovodi do smanjene osetljivosti bakterija produkora jedino uz smanjenu permeabilnost spoljašnje membrane.⁷⁴

Zbog otpornosti na β -laktamaze proširenog spektra delovanja, karbapenemi se preporučuju kao prva linija u borbi protiv teških infekcija izazvanih ESBL pozitivnim sojevima.⁷⁵

1.2.1. Poreklo rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija i vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Prvi prirodni karbapenem, tienamicin, otkriven je u mikroorganizmu iz zemljišta, *Streptomyces cattleya*.^{76, 77} Imipenem je N-formimidoil derivat tienamicina. Prvi identifikovani izolat produktor serin karbapenemaza je SME-1 pozitivna vrsta *Serratia marcescens* (*S.marcescens*) iz Londona, identifikovana 1982. godine,⁷⁸ i *Enterobacter cloacae* (*E.cloacae*) produktor IMI-1, identifikovan 1984. godine u SAD.⁷⁹ Isto tako, OXA-23 iz klase D karbapenemaza, identifikovana je u izolatu *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) iz 1985. godine u Velikoj Britaniji.⁸⁰ Imipenem je za kliničku upotrebu odobren 1985. godine u SAD⁸¹ pa se može zaključiti da je rezistencija na ovaj lek postojala i mnogo ranije kod bakterija u okruženju, i da klinička upotreba karbapenema nije jedini uzrok nastanka klase A i D karbapenemaza.

Mikroorganizmi iz okruženja nose gene koji kodiraju enzime za hidrolizu karbapenema i tako sebi obezbeđuju opstanak. Dortet i saradnici otkrivaju čvrstu povezanost gena *bla_{NDM-1}* sa *ble_{MBL}* genom koji kodira funkcionalni bleomicin rezistentni protein.⁸² Oni su deo istog operona i koeksprimiraju se pod kontrolom istog promotora, parcijalno formiranog na 3` kraju insercione sekvence IS*Aba125*. Produkcija bleomicin rezistentnog proteina smanjuje spontani nivo mutacija koji zavisi od mehanizama rekombinacione reparacije, dovodeći do stabilizacije *bla_{NDM-1}* gena i time omogućavajući bakterijama da opstaju u spoljašnjoj sredini zahvaljujući selekciji posredovanoj prirodnom produkcijom bleomicinu sličnih molekula. U genetskoj strukturi *A. baumannii*, *bla_{NDM-1}* gen predstavlja deo složenog transpozona Tn*125* sastavljenog od dve kopije IS*Aba125*. Kod bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* identifikovan je samo deo ovog transpozona. Proučavajući

veliki broj enterobakterija koje stvaraju NDM enzime (NDM produkujućih enterobakterija), zapaža se da današnja rasprostranjenost *bla*_{NDM-1} gena nije uslovljena širenjem specifičnog klona, specifičnog plazmida niti diseminacijom neke određene genetske strukture. Vidi se da je *bla*_{NDM-1} gen uvek povezan svojim 5' krajem sa ostatkom insercione sekvence ISAb₁₂₅ (nađene najpre u *A.baumannii*).

Kako je *bla*_{NDM-1} gen identifikovan kao deo složenog transpozona Tn125, koji je sastavljen od dve kopije ISAb₁₂₅, pretpostavlja se da je *bla*_{NDM-1} gen prvo bio integrisan u hromozom *A.baumannii* iz nepoznate komenzalne vrste, a iz njega plazmidskom replikacijom dospo u enterobakterije. Visok sadržaj G/C u ovom genu ukazuje na poreklo iz bakterija komenzala, ili Gram-pozitivnih *Streptomyces-like* vrsta, ili *Stenotrophomonas-like* vrsta, kao progenitora rezistencije na karbapeneme.⁸³

Transpozon Tn4401, koji sadrži *bla*_{KPC-2} gene kod *K.pneumoniae* nedavno je opisan u pCOL-1 plazmidu *P.aeruginosa* ukazujući na mogućnost prenosa ovih gena rezistencije sa enterobakterija na vrstu *P.aeruginosa*. Integron klase I je mobilni genetski element na kome se nalaze *bla*_{VIM-2} geni kod *P.aeruginosa*. Treba naglasiti i činjenicu da sadržaj G/C, koji služi za diferenciranje različitih karbapenemaza, veoma varira u okviru određenih tipova- kod OXA enzima srednja vrednost G/C iznosi 38,06%, a kod NDM enzima 61,5%. Takođe, procenat sličnosti među karbapenemazama može biti vrlo nizak (<10%). Ove činjenice ukazuju na mogućnost da geni koji kodiraju karbapenemaze imaju različito evoluciono poreklo, iako pokazuju sličnu enzimsku aktivnost na istu klasu antibiotika, sa manjom ili većom efikasnošću.⁸⁴

1.3 Mehanizam rezistencije Gram-negativnih bacila na karbapeneme

Kod bakterijskih vrsta porodice *Enterobacteriaceae* i vrste *P.aeruginosa* postoje dva glavna mehanizma rezistencije na karbapeneme. Ona može biti posredovana enzimskim (karbapenemaze)⁸⁵ i neenzimskim mehanizmima: izmena penicilin-vezujućih proteina,^{86, 87} povećano izbacivanje karbapenema iz ćelije (*efflux* mehanizam)^{88, 89} i smanjena propustljivost spoljašnje membrane uzrokovana kvalitativnom ili kvantitativnom izmenom ekspresije porina.^{90, 91} Kombinovani mehanizam rezistencije uključuje smanjenu propustljivost spoljašnje membrane udruženu sa visokim nivoom produkcije drugih β-laktamaza, uključujući AmpC β-laktamaze i ESBL.^{92, 93}

1.3.1 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod Gram- negativnih bacila (karbapenemaze)

Karbapenemaze predstavljaju enzime iz grupe β -laktamaza koje hidrolizuju karbapeneme. Dele se na urođene (kodirane genima lociranim na hromozomu) i stečene karbapenemaze (kodirane genima koji se nalaze na mobilnim genetskim elementima, uključujući transpozone, integrone i plazmide). U urođene hromozomske β -laktamaze spadaju enzimi nekih vrsta bakterija kao što su *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp.*, *Chryseobacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Bacteroides fragilis*. Kod enterobakterija i kod vrste *P.aeruginosa* uglavnom se radi o stečenim karbapenemazama.

Klasifikacija β -laktamaza, enzima kojima pripadaju i karbapenemaze, može biti bazirana na njihovoj strukturi po Ambler-u ili na funkcionalnim karakteristikama enzima (prema Karen Bush). Molekularna klasifikacija stečenih β -laktamaza po Ambler-u temelji se na upoređivanju nukleotidnih i amino-kiselinskih sekvenci iz tih enzima.⁹⁴ Do sada, postoje tri klase karbapenemaza (A, B i D), koje koreliraju sa funkcionalnom klasifikacijom definisanom na osnovu enzimskih supstrata i profila inhibitora.⁹⁵ Klase A i D obuhvataju enzime kod kojih je aktivno mesto serin (serin-karbapenemaze), a klasa B su metalo- β -laktamaze (MBL), za čiju su hidrolitičku aktivnost potrebni cinkovi joni. Značajan broj β -laktamaza iz sve tri molekularne klase nalazi se kod enterobakterija i kod vrste *P.aeruginosa*.⁹⁶

Funkcionalna klasifikacija enzima bazirana je na hidrolitičkom profilu njihovih supstrata. Prema ovoj klasifikaciji, serin karbapenemaze molekularne klase A pripadaju subklasi 2f. Većina, osim hidrolize karbapenema, deluje i na aztreonam. Bolje ih inhibira tazobaktam od klavulanske kiseline, i hidrolizuju cefalosporine proširenog spektra. Karbapenemaze klase B (metalo- β -laktamaze) spadaju u 3a i 3b subklasu, hidrolizuju sve beta-laktamske antibiotike osim monobaktama. Karbapenemaze klase D kojima pripada i enzim OXA-48 spadaju u 2df subklasu. Njihove funkcionalne karakteristike su hidroliza karbapenema (hidroliza imipenema brža je u odnosu na meropenem), hidroliza oksacilina i kloksacilina i nisu inhibirani klavulanskom kiselinom.⁹⁵

Klasa A karbapenemaza

Klasa A (funkcionalna subklasa 2f po K. Bush) obuhvata četiri familije koje su filogenetski različite: GES, KPC, SME, IMI/NMC. Najvažniji enzimi- predstavnici klase A su: GES-2 kod vrste *P.aeruginosa*, GES-4 kod vrste *K.pneumoniae*, GES-5 kod vrste *E. coli*, GES-6 kod *K.pneumoniae*, SME-1, SME-2 i SME-3 kod *S. marcescens*, IMI-1 kod *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), KPC-1, KPC-2 i KPC-3 kod *K.pneumoniae*, KPC-4 kod *Enterobacter* sp., NMC-A kod *E. cloacae*, SFC-1 kod *Serratia fonticola* i SHV-38 kod *K.pneumoniae*.⁹⁷ Rezistencija na karbapeneme uslovljena ovim enzimima može biti hromozomskog (NMC-A, SME, IMI-1, SFC-1) ili plazmidskog porekla (KPC, IMI-2, GES). Geni *bla*_{GES} nalaze se na genskim kasetama integra 1a, *bla*_{KPC} geni i *bla*_{IMI-2} geni smešteni su na transpozonima ili plazmidima. Oni kodiraju produkciju enzima koji hidrolizuju aminopeniciline, ureidopeniciline, cefalosporine prve i druge generacije, aztreonam, ertapenem, imipenem i meropenem. Vrlo slabo hidrolizuju meropenem (s izuzetkom KPC) tako da retko uzrokuju klinički značajnu rezistenciju, a ne deluju ni na cefamicine (cefoksitin, cefotetan). Inhibitorno dejstvo klavulanske kiseline, tazobaktama i sulbaktama na ove enzime je varijabilno.⁹⁸

Familiju enzima GES (engl.- *Guiana extended- spectrum β lactamases*) čini 26 enzima.⁹⁹ Ovu familiju čine enzimi proširenog spektra delovanja (ESBL), a samo GES- 2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 i GES-18 pokazuju merljivu enzimsku aktivnost na karbapeneme.¹⁰⁰ Enzimi GES najčešći su kod vrste *P.aeruginosa*, ali su otkriveni i kod enterobakterija. Najčešće su detektovani u Evropi, Južnoj Africi i na Dalekom istoku. U julu 2000. godine, registrovana je epidemija izazvana GES-2 pozitivnim izolatom *P.aeruginosa* u Južnoafričkoj republici¹⁰¹, a 2004. godine GES-5 pozitivna *K.pneumoniae* izazvala je epidemiju u Koreji.¹⁰²

Karbapenemaza SME-1 prvi je put otkrivena u izolatu *S. marcescens* iz Velike Britanije 1982.⁷⁸ Ove karbapenemaze hromozomskog porekla (SME-1, SME-2, SME-3) javljaju se kod izolata *S. marcescens*, detektuju se retko, najčešće izazivaju sporadične infekcije i ne pokazuju potencijal epidemijskog širenja.¹⁰³ Bazalni nivo ekspresije SME-1 je nizak i raste u prisustvu induktora imipenema,¹⁰⁴ što dovodi do neznatnog povećanja aktivnosti SME-1 prema ovom AML.

Karbapenemaze IMI i NMC-A (engl.- *imipenemase/non-metallo carbapenemase-A*) opisane su sporadično u izolatima *E.cloacae* u SAD,¹⁰⁵ Kini¹⁰⁶ i Argentini,¹⁰⁷ kao i u izolatima enterobakterija iz površinskih voda u SAD.¹⁰⁸ Upotreba imipenema, kao kod SME-1, indukuje

povećano stvaranje IMI-1 enzima što značajno povećava rezistenciju na ovaj AML. Gen *bla*_{IMI-1} nalazi se na hromozomu, dok su *bla*_{IMI-2} geni plazmidskog porekla.¹⁰⁶

K.pneumoniae karbapenemaze (KPC) su klinički najznačajnija familija enzima klase A. Prva, KPC-1 kod *K.pneumoniae*, identifikovana je u izolatu iz 1996. godine na istočnoj obali SAD i objavljena 2001. godine.¹⁰⁹ Nakon KPC-1 opisane su i druge dve alelske varijante: KPC-2 i KPC-3^{110, 111} a ukupno su detektovane 24 varijante.⁹⁹ Za nekoliko godina, proširile su se na skoro celu teritoriju SAD, sa dominacijom u istočnom delu zemlje. Na području Njujorka smatraju se endemičnim, a do danas su opisane širom sveta.^{112, 113, 114} Iako su najčešće detektovani kao izazivači hospitalnih infekcija, izolati koji produkuju ove enzime mogu se naći i među izolatima iz uzoraka dobijenih od ambulantno lečenih pacijenata. Smrtnost od infekcija izazvanih KPC produktorima je visoka (preko 50%). Osim rezistencije na karbapeneme, ova pojava vezana je i za udruženu rezistenciju na druge antimikrobne lekove (multirezistenciju). Najzastupljenije su kod *Klebsiella spp.*, ali su u manjem broju prisutne i kod drugih predstavnika porodice enterobakterija. KPC-enzimi opisani su kod *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *S. marcescens*, *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), ali i kod nefermentativnih bakterija kao što su *Pseudomonas spp.* i *Acinetobacter spp.*^{115, 27} Detekcija KPC pozitivnih izolata može biti otežana u rutinskom radu. Postoji više razloga koji onemogućavaju detekciju KPC enzima. Kod nekih sojeva, produkcija enzima ne mora uzrokovati rezistenciju na sve karbapeneme, već se može raditi o izolovanom smanjenju osetljivosti na samo jedan od njih (najčešće ertapenem).¹¹⁶ Lažno pozitivni fenotipski testovi mogu se javiti kod ESBL produktora,¹¹⁷ a inokulum male gustine kod automatizovanih sistema može dati lažno negativne rezultate (nemogućnost detekcije KPC).¹¹⁸ Otežano otkrivanje ovih enzima onemogućava praćenje incidence i može imati ozbiljne posledice na terapiju infekcija izazvanih sojevima koji ih produkuju. Takođe, KPC-2 pozitivni izolati enterobakterija kod pacijenata iz Izraela i Kolumbije^{119, 120} koji nisu imali kontakta sa američkom kontinentom i nosilaštvo KPC pozitivnih izolata kod pacijenata iz Kine¹²¹ ukazuju na mogućnost postojanja sekundarnih rezervoara ovakvih izolata.

Na određenom geografskom području može biti prisutno više različitih klonova koji se razlikuju po MLST profilu (višelokusno sekvencijsko tipiziranje, engl.- *multilocus sequence typing*), drugim prisutnim β-laktamazama, veličini, broju i strukturi plazmida. Najšire rasprostranjen u svetu je specifični *K.pneumoniae* klon, ST258, sa ekspresijom *bla*_{KPC-2} gena. Dokazano je da su *bla*_{KPC} geni vezani za transpozon Tn4401. To je Tn-3 -like transpozon, koji je kod enterobakterija i vrste *P.aeruginosa* nađen na različitim lokusima na plazmidu i na plazmidima različitih veličina.¹²²

Zabeležene su i epidemije izazvane sojevima pozitivnim na prisustvo KPC enzima.¹¹¹ U Njujorku su, u različitim bolnicama, od 2003-2004. godine zabeležene tri epidemije, izazvane istim KPC-2 ribotipom, što ukazuje na klonalnu ekspanziju.¹²³

Klasa B karbapenemaza

Metalo- β -laktamaze su klinički najvažnije karbapenemaze. Metalo- β -laktamaze (MBL)-Ambler klasa B/funkcionalna subklasa 3a i 3b po K. Bush, kodirane su genima na plazmidu ili integronu, mogu hidrolizovati sve β laktamske antibiotike osim monobaktama (aztreonam) i ne inaktiviraju ih inhibitori β laktamaza (klavulanska kiselina, tazobaktam i sulbaktam). Razlikuju se od ostalih karbapenemaza po tome što kao kofaktore za enzimsku aktivnost koriste dvovalentne cinkove jone. Hidroliza je uslovljena interakcijom beta laktamskih antibiotika sa jonom Zn na aktivnom mestu, što objašnjava inhibiciju njihove aktivnosti u uslovima *in vitro* posredstvom etilen-diamino-tetrasirćetne kiseline (EDTA) i drugih helatora cinkovih jona (dipikolonična kiselina).⁹⁶ Vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) na karbapeneme kod MBL produktora može varirati od senzitivnog do rezistentnog.¹²⁴ Stopa smrtnosti od infekcija izazvanih MBL pozitivnim sojevima kreće se od 18% do 67%.¹²⁵ Prve MBL dokazane su kod oportunističkih bakterija-*Bacillus cereus*, *Aeromonas sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Legionella gormanii*. Najčešće su to bakterije iz spoljašnje sredine, koje poseduju unutrašnju ili hromozomsku rezistenciju. Hromozomske MBL se u ovim bakterijama najčešće nalaze zajedno sa još najmanje jednom serin β -laktamazom, pa se po izlaganju β -laktamskim AML indukuju oba enzima. Srećom, osim *S. maltophilia*, ostale vrste se retko sreću kao izazivači bolničkih infekcija, a hromozomski kodirani enzimi se karakterišu vertikalnom transmisijom pa je i opasnost od širenja u bolničkim sredinama manja. Od 1990. godine, naglo se povećava broj stečenih ili prenosivih gena koji kodiraju MBL, koji su opisani kod vrste *P.aeruginosa* i *A.baumannii*, ali su kasnije otkrivene i kod vrsta iz familije *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *S.marcescens*, *E.cloacae*, *E.coli*, *C.freundii*). Opisano je više familija MBL koje mogu hidrolizovati karbapeneme: IMP, VIM, GIM, SPM, NDM, AIM, KHM i TMB enzimi.⁹⁶ Geni koji ih kodiraju nalaze se u integronima gde su inkorporirani u genske kasete. Kao sastavni deo plazmida ili transpozona, integroni omogućavaju horizontalni genetski transfer tih gena među bakterijama. Rasprostranjene su u celom svetu, ali najviše u Evropi, Jugoistočnoj Aziji i Japanu.⁹⁶

Prva identifikovana stečena MBL je IMP, otkrivena u izolatu *P.aeruginosa* u Japanu 1990. godine. Enzim je nazvan IMP-1 (engl.- *active on imipenem*), a gen koji ga kodira nalazio se na

konjugativnom plazmidu.^{126, 127} U Evropi, ovaj enzim je dokazan u Italiji kod *Acinetobacter spp.*¹²⁸ Kod vrsta porodice *Enterobacteriaceae*, IMP-1 je prvi put otkrivena kod izolata *S.marcescens* u Japanu, 1991. godine a gen za njenu sintezu je bio lociran na integronu.¹²⁹ Od tada, detektovane su 53 IMP varijante širom sveta.⁹⁹ Endemska IMP postoji u Japanu, na Tajvanu, Istočnoj Kini, Grčkoj, a pojedinačni slučajevi registrovani su u mnogo zemalja. Ova selekcija dovodi se u vezu sa upotrebom karbapenema.

Geni koji kodiraju IMP-1 enzim (*bla_{IMP-1}*) locirani na konjugativnom plazmidu kod vrste *P.aeruginosa*, nađeni su i na integronima prisutnim kod *S.marcescens* i drugih pripadnika porodice *Enterobacteriaceae* u Japanu, a prvi član IMP porodice detektovan u Evropi, IMP-2 enzim, nađen je u klasi 1 *In31* integrona kod *A.baumannii* koji može sadržati više različitih gena rezistencije. Ovi geni su udruženi u genske kasete, koeksprimirane pomoću jednog promotora. Kodiraju smanjenu osetljivost na različite grupe AML (beta-laktamski antibiotici, sulfonamidi, hloramfenikol, aminoglikozidi). U genskim kasetama koje sadrže *bla_{IMP}* gen otkriveni su i geni rezistencije na aminoglikozide (*aacA4*, *aadA1*, *aadB*), hloramfenikol (*catB*) i geni koji kodiraju klasu D beta laktamaza (*bla_{OXA}*). Integroni nisu samostalno mobilni, već su obično identifikovani unutar transpozona, što omogućava njihov prenos i širenje.¹³⁰

Enzim IMP-3 opisan je u Japanu 1998. godine u izolatu *Shigella flexneri*.¹³¹ Ovo je prva metalo-β-laktamaza detektovana u vanbolničkom izolatu.¹³² Metalo-β-laktamaza IMP-4 je prvi put opisana u Hong Kongu 2001. godine u izolatima *A. baumannii* iz hospitalne epidemije.¹³³ Prva IMP-5 β-laktamaza detektovana je u Portugaliji, 1998. godine, u izolatu *A. baumannii* iz urina. Genetski je bila sličnija sa IMP-1, IMP-3 i IMP-4 nego sa IMP-2. Jedina genska kasete u klasi 1 *In76* integrona bila je *bla_{IMP-5}*.¹³⁴ Karbapenemaza IMP-6 je prvi put opisana u Japanu 2001. godine, u izolatu *S.marcescens* dobijenom iz urina.¹³⁵ Tokom 2000-2001. godine različite varijante IMP enzima nađene su u Gram-negativnim bakterijama širom sveta. Enzim IMP-7 identifikovan je kod kliničkog izolata *P.aeruginosa* u Kanadi^{136, 137} i Singapuru,¹³⁸ varijanta IMP-8 detektovana je kod *E. cloacae* sa Tajvana,¹³⁹ IMP-9 u Kini¹⁴⁰ i IMP-13 u Italiji.¹⁴¹ Varijanta IMP-16 opisana je u Brazilu.¹⁴² Geni koji kodiraju IMP enzime su takođe locirani na klasi 1 integrona koji nosi i gene za enzime koji modifikuju dejstvo aminoglikozida. Enzim IMP-18 otkriven je u SAD.¹⁴³ Na području Balkana registrovane su IMP metalo-β-laktamaze u Hrvatskoj.¹¹³ Varijanta IMP-35 otkrivena je kod multirezistentnog izolata *P.aeruginosa* na belgijsko-nemačkoj granici.¹⁴⁴ Do danas su opisane 53 alelske varijante ovog enzima.⁹⁹

Najrasprostranjenija MBL familija je VIM (engl.- *Verona-integron encoded metallo-β-lactamase*), sa 46 opisanih varijanti.⁹⁹ Izolati produktori ovih enzima takođe mogu uzrokovati epidemije bolničkih infekcija. Karbapenemaza VIM-1 je prvi put otkrivena u Veroni 1997. godine.¹⁴⁵ Kasnije je opisana i kod vrsta *E. coli*, *K.pneumoniae* i *E.cloacae*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Providencia stuartii* (*P.stuartii*), *Morganella morganii* (*M.morganii*) iz Grčke, *K.pneumoniae* i *P.stuartii* iz Francuske, *E. coli* i *K.pneumoniae* iz Španije.^{146, 147} Gen *bla*_{VIM-1} je deo genske kasete insertovane u klasi 1 In70 integrona, u kome se nalaze i integraza kodirajući gen, *bla*_{VIM-1} i *aacA4* gen koji uslovljava rezistenciju na aminoglikozide.¹⁴⁸ Enzim VIM-2 opisan je u Francuskoj 1996. godine, u izolatu *P.aeruginosa*.¹⁴⁹

Karbapenemaza VIM-2 opisana je i kod vrste *C. freundii* (Tajvan)¹³⁹ i vrste *E. cloacae* (Južna Koreja).¹⁵⁰ Detektovana je i u drugim enterobakterijama i nefermentativnim Gram-negativnim bakterijama. Ova karbapenemaza je najčešće opisivana metalo-β-laktamaza u celom svetu. Na Balkanu je opisana u Hrvatskoj, u Splitu i Zagrebu, u izolatima *P.aeruginosa*.^{151, 152} Enzim VIM-3 identifikovan je na Tajvanu.¹⁵³ Karbapenemaza VIM-4 je prvi put opisana u izolatima *P.aeruginosa* iz Grčke i kasnije u izolatima *K.pneumoniae* i *E.cloacae* u Italiji kod bolesnika koji je prethodno lečen karbapenemima.^{154, 155} Prisustvo ovog enzima dokazano je i u Mađarskoj¹⁵⁶, Poljskoj¹⁵⁷ i Švedskoj.¹⁵⁸

Karbapenemaza VIM-5 je opisana kod izolata *P.aeruginosa* iz Turske 2003. godine,¹⁵⁹ a enzim VIM-6 je opisan u Singapuru 2000. godine, u izolatu *Pseudomonas putida*.¹⁶⁰ Enzim VIM-7 je prvi put opisan u SAD-u 2001. godine, u izolatu *P.aeruginosa*.¹⁶¹ Alelske varijante VIM 8-11 takođe su opisane kod *P.aeruginosa*.¹⁶² Karbapenemaza VIM-12 je nađena u Grčkoj 2007. godine, u izolatu *K.pneumoniae*, a zatim i u izolatima *E. coli* i *E. cloacae*.¹⁶³ Varijante VIM-13-VIM-18 opisane su u Španiji,¹⁶⁴ Bugarskoj i Nemačkoj,¹⁶⁵ u izolatima *P.aeruginosa*. Enzim VIM-19 opisan je u Grčkoj 2008. godine u izolatu *K.pneumoniae*. Do sada je opisano 46 alelskih varijanata VIM metalo-β-laktamaza.⁹⁹

Treći predstavnik MBL je familija SPM-1 (engl.- *Sao Paolo imipenemase*). Prvi put je *bla*_{SPM-1} gen lociran na plazmidu detektovan u Brazilu 2002. godine kod *P.aeruginosa*.¹⁶⁶ Ovaj tip enzima razlikuje se po strukturi i od VIM i IMP enzima. Ima veći afinitet prema cefalosporinima u odnosu na peniciline. U Evropi je opisan prvi put SPM enzim opisan u izolatu *P.aeruginosa* importovanom iz Brazila.¹⁶⁷ U klasu MBL spada i SIM enzim (engl.-*Seul imipenemase*),¹⁶⁸ karbapenemaza koja je po strukturi najbliža IMP metalo-β-laktamazama. Ovaj enzim opisan je kod *P.aeruginosa* i *A. baumannii*.

Najrasprostranjeniji enzimi iz klase MBL su predstavnici NDM familije. Prvi put su opisani u Švedskoj 2008. godine, u izolatu *K.pneumoniae* importovanom iz Indije.¹⁶⁹ Do 2010. godine izveštavano je njihovo prisustvo samo na Indijskom potkontinentu,¹⁷⁰ da bi se kasnije počele da detektuju u različitim delovima sveta. Veliki broj opisanih slučajeva odnosi se na NDM-1 pozitivne sojeve koji su u Kanadu, SAD, Evropu i Aziju preneti iz Indije.^{171, 172} Pacijenti sa izolatima pozitivnim na produkciju NDM enzima imali su ili infekciju ili kolonizaciju ovim sojevima čije prisustvo je dokazano i u vodi za piće i otpadnim vodama u Indiji.¹⁷³ Kasnija istraživanja ukazuju na mogućnost da Balkan i Srednji Istok predstavljaju sekundarni rezervoar NDM enzima. NDM-1 β laktamaza nađena je i u Hrvatskoj, u izolatu *K.pneumoniae* kod bolesnika iz Bosne i Hercegovine, bez anamnestičkih podataka o boravku u Indiji pa je moguće da se radi o „balkanskom klonu”.¹⁷⁴

Karbapenemaza NDM se po genetskoj strukturi razlikuje od ostalih klasa MBL.¹⁶⁹ Najčešće je prisutna kod *E.coli* i *K.pneumoniae*, ređe kod drugih vrsta enterobakterija, kao i kod *P.aeruginosa* i *A.baumannii*.

Gen *bla*_{NDM-1} lociran je na plazmidu koji može sadržati i gene koji kodiraju ESBL, OXA-48, VIM enzime, plazmidske AmpC enzime, gene rezistencije na aminoglikozide, sulfametoksazol, makrolide i rifampicin. Zahvaljujući plazmidskom poreklu, mogu se prenositi horizontalnim transferom i dovesti do nastanka i širenja multirezistentnih ili panrezistentnih sojeva. Mnogi od ovih sojeva osetljivi su samo na tigeciklin i kolistin, neki i na fosfomicin,¹⁷⁵ pa predstavljaju veliki terapijski problem. Poseban problem sa epidemiološkog stanovišta predstavlja i činjenica da je rezervoar ovih enzima ogroman- Indijski potkontinent sa više od 1,4 milijarde ljudi. Enzimi NDM su, osim u hospitalnim sredinama, gde su najčešće detektovani kod *K.pneumoniae*, prisutni i u izolatima vanbolničkog porekla. U nekim delovima Pakistana registrovano je oko 20% zdravih nosilaca NDM pozitivnih sojeva, a ovi sojevi su prisutni čak i u vodovodskoj i površinskim vodama.¹⁷⁰ Velika zastupljenost NDM enzima kod MDR enterobakterija predstavlja ozbiljnu opasnost za dalje širenje multirezistentnih klonova.

Za razliku od drugih MBL, *bla*_{NDM-1} gen nije vezan samo za jedan klon. Od posebnog je značaja otkrivanje ST131 klona *E.coli* koji nosi i gen koji kodira CTX-M-15 ESBL,¹⁷⁶ najčešće izaziva vanbolničke infekcije¹⁷⁷ i široko je rasprostranjen. Opisano je 16 alelskih varijanti ovog enzima.⁹⁹

Jedna od skoro otkrivenih β laktamaza u klasi MBL su DIM (engl.- *Dutch imipenemase*). Gen koji kodira DIM-1 β laktamazu nalazi se na integronu, a opisan je u Holandiji kod vrste *Pseudomonas stutzeri*.¹⁷⁸ Nedavno je otkrivena KHM-1 u Japanu, iz izolata *C. freundii* koji je

poticao iz 1997.godine.¹⁷⁹ Najnovije otkrivena MBL je Tripoli metalo- β -laktamaza-1 (TMB-1) detektovana u Japanu, u izolatu *Acinetobacter spp.* sa smanjenom osetljivošću na imipenem.¹⁸⁰

Klasa D β -laktamaza (oksacilinaze)

U molekularnoj klasi D β laktamaza (funkcionalna subklasa 2d po K. Bush) nalaze se oksacilinaze koje hidrolizuju karbapeneme, tipične za vrstu *A. baumannii*, ali se sve češće izveštava pojava ovih enzima kod enterobakterija, posebno kod vrste *K.pneumoniae*.^{181, 182} Klasični OXA enzimi (OXA-1, OXA-2, OXA-10) ne hidrolizuju ceftazidim i dovode do rezistencije na karboksipeniciline i ureidopeniciline.¹⁸³ Najveći klinički značaj imaju oksacilinaze proširenog spektra (OXA-11, OXA-15, OXA-18 i OXA-45) kod enterobakterija i OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17 OXA-19 i OXA-28 kod vrste *P.aeruginosa* koje hidrolizuju ceftazidim, cefotaksim, cefepim, cefpirom, aztreonam i moksalaktam.¹⁸⁴ Osim OXA-18, aktivnost ovih enzima ne suprimiraju inhibitori β -laktamaza (klavulanska kiselina i tazobaktam). Nepostojanje specifičnog inhibitora otežava njihovu identifikaciju u rutinskom radu.¹⁸⁵ Osim hidrolize β -laktamskih antibiotika uključujući i cefalosporine proširenog spektra i aztreonam oni imaju i varijabilno dejstvo na karbapeneme. Najčešća karbapenemaza grupe D kod enterobakterija je OXA-48 β laktamaza koja je opisana prvo u Turskoj u izolatima *K.pneumoniae* gde je najrasprostranjenija,^{186, 187} ali je detektovana i u Nemačkoj i Belgiji,¹⁸⁸ kao i OXA-181. Enzim OXA-48 nije klasična karbapenemaza, i potpuna rezistencija na karbapeneme postiže se udruženim dejstvom enzima i izmene porina ili postojanja *efflux* pumpi. Širenje rezistencije na karbapeneme uzrokovano oksacilinazama kod enterobakterija najčešće je posredovano plazmidima.¹⁸⁹

1.3.1.1 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod enterobakterija

Stečena rezistencija na karbapeneme je i u sadašnjem trenutku relativno retka kod enterobakterija. Enzimski rezistencija na karbapeneme može nastati zbog produkcije karbapenemaza iz klase A- KPC, IMI, NMC, SME⁹⁸ koje su varijabilno osetljive na inhibiciju klavulanskom kiselinom, metalo- β -laktamaza od kojih su najčešće IMP, VIM ili NDM¹²⁴ ili OXA-48 β -laktamaze.¹⁹⁰

Rezistencija na karbapeneme može nastati i kao posledica kombinacije dve vrste mehanizama- hiperprodukcije β -laktamaza proširenog spektra delovanja ili plazmidskih AmpC β -

laktamaza sa izmenom ili gubitkom porina,^{191, 192} ali je rezistencija posredovana produkcijom karbapenemaza od većeg epidemiološkog i kliničkog značaja. Karbapenemaze iz grupe A česte su u SAD-u i kod enterobakterija su opisani izolati *S. marcescens* sa smanjenom osetljivosti na karbapeneme,^{193, 194} *E. cloacae* pozitivni na NMC-1 β -laktamazu¹⁰⁵ i *K.pneumoniae* pozitivni na KPC β -laktamaze,¹¹⁰ koja je endemska za područje Njujorka. Enzimi KPC široko su rasprostranjeni u Evropi ali i celom svetu. U Izraelu i Velikoj Britaniji preovladavaju tipovi KPC-2 i KPC-3.¹⁹⁵ KPC-pozitivni izolati *K.pneumoniae* opisani su i u Švajcarskoj,¹⁹⁶ Nemačkoj,¹⁹⁷ Belgiji¹⁹⁸ i Italiji.¹⁹⁹ U Evropi su prisutne u Francuskoj gde je IMI-1 β -laktamaza²⁰⁰ opisana kod *E. cloacae* i *K.pneumoniae* pozitivna na produkciju GES-1.¹⁰⁰ Pojedine karbapenemaze grupe B (MBL) karakteristične su za određene regije kao što je Grčka, gde se kao endemske detektuju metalo- β -laktamaze iz familije VIM u izolatima *E.cloacae* i *K.pneumoniae*. Na Dalekom istoku i u Indiji kod enterobakterija su najčešće opisane NDM β -laktamaze.^{201, 202}

Iz klase D dominantan tip karbapenemaze u izolatima *K.pneumoniae* u Turskoj je OXA-48 β -laktamaza. U Grčkoj, Nemačkoj i Kini opisani su sojevi sa simultanom produkcijom KPC i metalo- β -laktamaza.¹²⁴ U Hrvatskoj su do sada opisane stečene karbapenemaze NDM (*K.pneumoniae*), KPC (*K.pneumoniae*)²⁰³ i VIM (*E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *S.marcescens*).^{151, 152}

1.3.1.2 Enzimski posredovana rezistencija na karbapeneme kod vrste Pseudomonas aeruginosa

P.aeruginosa predstavlja fenomen u bakterijskoj rezistenciji jer poseduje brojne urođene mehanizme, kao što je konstitutivna ekspresija AmpC β -laktamaze, efluksne membranske pumpe, porinske mutacije, ali može imati i stečene mehanizme rezistencije, među kojima su i stečene karbapenemaze.²⁰⁴ Dokazano je da *P.aeruginosa* produkuje karbapenemaze iz klase A. Među predstavnicima ove grupe su GES-2, opisana 2000. godine u Južnoj Africi, GES-5, iz Francuske i Južne Afrike, i GES-18, detektovana u izolatu *P.aeruginosa* iz Belgije.^{205, 206} Klasi A pripada i KPC-2 karbapenemaza prvi put opisana u izolatu iz Kolumbije 2007. godine,²⁰⁷ kao i KPC-5 karbapenemaza u izolatu *P.aeruginosa* iz Portorika.²⁰⁸ Enzimski posredovana rezistencija *P.aeruginosa* na karbapeneme najčešće je uzrokovana metalo- β -laktamazama. Enzimi VIM i IMP su najzastupljeniji enzimi iz ove klase. Enzimi IMP prvi su put otkriveni u Japanu 1988,¹²⁶ i karakteristični su za ovo područje. U Evropi su detektovani u Italiji, i to varijante IMP-13, IMP-16,

IMP-22 iz bolničkih izolata *P.aeruginosa*^{129, 209} a IMP-29 opisana je u Francuskoj.²¹⁰ Prvi enzim iz familije VIM opisan je 1999. godine u Italiji, u izolatu *P.aeruginosa* iz 1997. godine.¹⁴⁵

Najrasprostranjenija na svim kontinentima je alelska varijanta VIM-2, prvi put opisana u Francuskoj 2001.²¹¹ U Evropi je njeno prisustvo registrovano u mediteranskim zemljama (Italija, Francuska, Grčka, Portugalija i Španija), centralnoevropskim zemljama (Poljska, Belgija, Nemačka), a od balkanskih zemalja Srbija²¹² i Hrvatska.¹⁵¹ U svetu, VIM familija enzima resprostranjena je i u Južnoj i Severnoj Americi, Kanadi, Aziji i Indiji. Poslednje opisani varijante su IMP-33 (Italija), VIM-36 (Belgija) i VIM-37 (Poljska).²¹³

Metallo- β -laktamaza SPM-1 iz Brazila detektovana je 2002. godine kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*¹⁶⁶ a GIM-1 enzim 2004. godine u Nemačkoj. U izolatu *P.aeruginosa* na australijskom tlu detektovana je AIM-1 (engl.-*Adelaide imipenemase*) metallo- β -laktamaza.²¹⁴ Enzimi NDM kod vrste *P.aeruginosa* uglavnom se vezuju za Egipat i Indiju,²¹⁵ ali ima izolata i iz Srbije koji produkuju ovaj enzim.²¹⁶

Iz klase D karbapenemaza OXA-10 se najčešće opisuje, ali su i varijante OXA-4, OXA-2, OXA-30, OXA-17, OXA-13, OXA-19 prisutne u mnogim zemljama Evrope i sveta (Turska, Francuska, Bugarska, Iran, Koreja, Indija).²¹⁷

1.3.2 Rezistencija Gram- negativnih bacila na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama

Kod Gram-negativnih bacila iz familije *Enterobacteriaceae* i kod vrste *P.aeruginosa* postoje i drugi mehanizmi rezistencije na karbapeneme: smanjeno preuzimanje antibiotika zbog kvalitativne ili kvantitativne izmene ekspresije porina, udruženo sa prekomernom produkcijom β - laktamaza koje imaju vrlo slab afinitet prema karbapenemima.

1.3.2.1 Rezistencija enterobakterija na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama

Spoljašnja membrana Gram-negativnih bakterija formira hidrofobnu barijeru koja štiti ćeliju od ulaska molekula kao što su teški metali i deterdženti iz spoljašnje sredine. Membrana sadrži specifične proteine, porine, hidrofilne kanale koji omogućavaju selektivno preuzimanje hranljivih materija, ali i antibiotika.^{218, 219} Porini koji učestvuju u preuzimanju antibiotika najčešće pripadaju familijama OmpF i OmpC.²¹⁹ Bilo kakva izmena u broju ili aktivnosti porina može dovesti do pojave bakterijske rezistencije. Smanjena osetljivost na antibiotike uzrokovana je izmenama u centralnom porinskom kanalu porin proteina, gubitkom ekspresije porina, ili izmenom tipa porina.

Izmena ekspresije porina uslovljena antimikrobnim lekovima regulisana je učešćem *mar* i *sox* operona, što kao posledicu ima smanjenje broja porina u spoljašnjoj membrani.²²⁰

Rezistencija na karbapeneme prvi put je detektovana kod enterobakterija, posebno kod *Enterobacter sp.* (manje od 1% izolata) kod kojih je detektovana prekomerna ekspresija gena koji kodira urođenu cefalosporinazu AmpC, kao i izmenu OmpF i OmpC porina. Slični mehanizmi detektovani su i kod *Serratia sp.*, *C. freundii* i *M. morgani*. Takođe, dokazani su i kod vrsta koje ne proizvode urođene cefalosporinaze, kao što su *E. coli*, *K.pneumoniae* i *Salmonella sp.* Kod ovih bakterijskih vrsta za rezistenciju je odgovorna kombinacija plazmidski kodirane AmpC ekspresije sa smanjenom propustljivošću uzrokovanom izmenom porina Omp K35/36 kod *K.pneumoniae*, OmpF i OmpC porina kod *E. coli* i OmpF kod *Salmonella enterica*.^{92, 221} Ambulantni i bolnički sojevi su u ovim ispitivanjima posedovali različite AmpC enzime (CMY-2, DHA-1, ACC-1).^{222, 223, 224, 225, 226} Geni za AmpC tip β -laktamaze poticali su od Gram- bacila kao što su *Hafnia alvei*, *M. morgani*, *Aeromonas spp.*,²²⁷ i preneseni su plazmidima. Geni za sintezu plazmidskih cefalosporinaza vrlo često su udruženi sa genima rezistencije na druge antimikrobne lekove (aminoglikozide, tetracikline, sulfonamide), koji se nalaze na istom plazmidu.²²³

Smanjena osetljivost na ertapenem kod izolata koji su posedovali udružene mehanizme rezistencije bila je detektovana u toku terapije ovim antibioticima.^{226, 228}

Produkcija ESBL u kombinaciji sa smanjenom propustljivošću spoljašnje membrane, dovodi do rezistencije na karbapeneme.⁹³ Geni koji kodiraju ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) takođe su vezani za plazmide. Jedan od takvih primera detektovan je u Italiji. Izolati su bili ESBL pozitivni i imali su novi tip porina- Omp K36V, što je uslovljelo rezistenciju na ertapenem, osetljivost na imipenem i intermedijarnu osetljivost na meropenem.²²⁹ Široko rasprostranjeni ESBL pozitivni sojevi (CTX-M) nameću potrebu obaveznog testiranja osetljivosti na ertapenem.¹⁹² Prekomerna ekspresija AcrA, komponente *efflux* pumpe, opisana je kao uzrok rezistencije na imipenem kod vrste *Enterobacter aerogenes (E.aerogenes)*.⁸⁸ Neke studije ukazuju na nestabilnost rezistencije uzrokovane izmenom porina.²²² Smanjena propustljivost spoljašnje membrane kao posledica mutacije ili gubitka porina dovodi do izmenjenog metabolizma, smanjenog unosa hranljivih materija i poremećenog procesa izbacivanja štetnih produkata iz ćelije. Time se ugrožava rast ćelije i njena sposobnost opstanka.

Sojevi koji su rezistentni na karbapeneme, a ne proizvode karbapenemaze, često su manje rezistentni na ostale antibiotike od sojeva koji proizvode karbapenemaze. Ova rezistencija ne

prenosi se horizontalnim putem, za razliku od karbapenemaza, već postoji samo vertikalna transmisija. Ovi sojevi čine manji deo populacije rezistentne na karbapeneme.

1.3.2.2 Rezistencija vrste *Pseudomonas aeruginosa* na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama

Izmenе porinskih kanala kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Spoljašnja membrana Gram-negativnih bakterija predstavlja polupropustljivu barijeru koja usporava ulazak AML. Propustljivost spoljašnje membrane vrste *P.aeruginosa* iznosi svega 8% propustljivosti membrane *E. coli*. Porini su vodeni kanali koji omogućavaju propustljivost membrane i ulazak hranljivih materija u ćeliju. Analizom genoma vrste *P.aeruginosa* identifikovano je 164 porina od kojih 64 imaju važnu ulogu u transportu šećera, aminokiselina, fosfata, dvovalentnih katjona.²³⁰ Nekoliko grupa hidrofилnih antibiotika- karbapenemi, aminoglikozidi, tetraciklini i neki fluorohinoloni takođe mogu ući u ćeliju koristeći ove kanale.²³¹ Gubitak ili izmena porinskih kanala smanjuje osetljivost na karbapeneme, ali ne i na ostale β -laktamske antibiotike. Izmena kanala najčešće je posledica mutacije gena koji kodira OprD protein.²³² Gubitak OprD proteina uzrokuje izolovanu rezistenciju na imipenem. U poređenju sa imipenemom, propustljivost za meropenem je u manjoj meri kompromitovana pa je i smanjena osetljivost na meropenem slabije izražena. Kod OprD mutanata MIK imipenema je od 8-32 μ g/ml, a za meropenem 2-4 μ g/ml.^{233, 234} Izmena OprD porina često se javlja u toku terapije imipenemom. U različitim studijama, rezistencija na imipenem pojavljuje se u toku terapije infekcija uzrokovanih vrstom *P.aeruginosa* u oko 25% pacijenata.²³⁵ Selekcija rezistentnih *P.aeruginosa* sojeva u toku terapije imipenemom je mnogo češća od pojave mutanata rezistentnih na ceftazidim, piperacilin ili ciprofloksacin.²³⁰

Effluks sistem kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Klinički izolati *P.aeruginosa* poseduju urođenu rezistenciju uslovljenu malom propustljivošću spoljašnje membrane zbog prisustva proteina velike molekulske mase- oko 50 kDa.²³⁶ Savremeni koncept je da ovi proteini (OprM, OprJ, OprN) učestvuju kao komponenta aktivnog *efflux* sistema (energetski zavisni sistem izbacivanja AML sa velikom specifičnošću za suspsrat). Urođen nivo rezistencije *P.aeruginosa* u velikoj meri određen je uzajamnim dejstvom male propustljivosti spoljašnje membrane i ovog sistema.²³⁰ Prekomerna ekspresija *efflux* sistema sa širokim spektrom različitih supstrata predstavlja važan neenzimski mutacioni mehanizam

P.aeruginosa . Uslovljava rezistenciju na β -laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme.²³⁷ *Efflux* takođe doprinosi razvoju multirezistencije na antipseudomonasne AML i predstavljaju ga četiri genetski različita trokomponentna sistema koji pripadaju RND familiji (engl.-*resistance-nodulation-division*)^{230, 237}: MexA–MexB–OprM, MexC–MexD–OprJ, MexE–MexF–OprN i MexX–MexY–OprM. Prva komponenta je protein lociran na citoplazmatskoj membrani (MexB, MexD, MexF i MexY) i funkcioniše kao energetski zavisna pumpa sa velikom specifičnošću za supstrat. Druga komponenta je protein spoljašnje membrane (engl.-*exit portal*) (OprM, OprJ, OprN i OprM). Treći protein- vezujući lipoprotein (MexA, MexC, MexE and MexX) nalazi se u periplazmatskom prostoru povezujući prethodna dva²³⁷.

Efflux sistemi MexA–MexB–OprM i MexX–MexY–OprM mogu biti uzročnici i urođene i stečene rezistencije kod *P.aeruginosa*, dok MexC–MexD–OprJ and MexE–MexF–OprN uzrokuju samo stečenu rezistenciju.²³⁸ Supstrati uključuju različite klase AML.²³⁹

Efflux sistem **MexA–MexB–OprM**

Mutacija *mexR* hromozomskog gena koji kodira MexR represorni protein dovodi do smanjenja produkcije represora što dovodi do povećane transkripcije *mexA–mexB–oprM* operona koji uslovljava hiperprodukciju MexA–MexB–OprM *efflux* sistema kod kliničkih izolata *P.aeruginosa*.²⁴⁰ Mutanti *nalB* imaju povećane vrednosti MIK i uslovljavaju rezistenciju na većinu β -laktamskih antibiotika (penicilini, cefalosporini, monobaktami, meropenem u izvesnoj meri, ali ne imipenem), hinolone, tetracikline, hloramfenikol i trimetoprim. Mogu biti selektovani *in vitro* ili u toku terapije fluorohinolonima, penicilinima ili cefalosporinima.²⁴¹ Osetljivost na aminoglikozide ne menja se pomoću ovog mehanizma.²⁴² MexA–MexB–OprM hiperekspresija kod *P.aeruginosa* dovodi do smanjene osetljivost na meropenem, ali ne i na ostale karbapeneme– imipenem i panipenem (u poređenju sa nemutiranim tipom *P.aeruginosa*). Razlog je različita molekularna struktura karbapenema– meropenem ima hidrofobne bočne nizove na drugoj poziciji što ga čini supstratom pogodnim za ovaj *efflux* sistem, dok imipenem i panipenem imaju hidrofilne bočne lance.

Efflux sistem **MexC–MexD–OprJ**

Mutacija na *nfxB* genu koji kodira transkripcionalni represor, dovodi do njegovog smanjenja i hiperekspresije *mexC–mexD–oprJ* operona, koji dovodi do hiperprodukcije MexC–MexD–OprJ *efflux* sistema. Ovaj operon se ne eksprimira konstitutivno, već samo kao posledica mutacije *nfxB*

gena.²⁴³ MexC–MexD–OprJ *efflux* sistem u najvećoj meri izbacuje cefalosporine širokog spektra (cefepim i cefpirom) iz bakterijske ćelije, kao i hinolone, makrolide, tetracikline i hloramfenikol²⁴⁴

Efflux sistem **MexE–MexF–OprN**

Mutacija na *nfxB* genu dovodi do hiperprodukcije MexE–MexF–OprN *efflux* sistema i rezistencije na hinolone, hloramfenikol i trimetoprim.²⁴⁵ *P.aeruginosa* mutanti pokazuju i unakrsnu rezistenciju na karbapeneme (uglavnom imipenem) i imaju smanjenu ekspresiju OprD proteina spoljašnje membrane.

Prekomerna ekspresija *efflux* sistema sa širokim spektrom različitih supstrata predstavlja važan mutacioni mehanizam *P.aeruginosa*. Osim rezistencije na karbapeneme, uslovljava rezistenciju i na druge antipseudomonasne antibiotike (ostale β -laktame, fluorohinolone, aminoglikozide i polimiksin B).

Izmena penicilin vezujućih proteina kod *Pseudomonas aeruginosa*

Najređi mehanizam rezistencije na beta laktamske antibiotike posredovan je izmenom penicilin vezujućih proteina. Vezuje se za terapiju imipenemom, kao i za upotrebu visokih doza piperacilina kod pacijenata sa cističnom fibrozom. Postoje i podaci o smanjenoj osetljivosti na β laktame zbog hiperprodukcije PBP-3.^{246, 86, 87}

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Primenom fenotipskih metoda utvrditi najčešće mehanizme rezistencije enterobakterija na karbapeneme
- Primenom fenotipskih metoda utvrditi najčešće mehanizme rezistencije na karbapeneme kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*
- Kod izolata rezistentnih na karbapeneme ispitati mehanizam rezistencije primenom molekularnih metoda- lančanom reakcijom polimeraze (engl.- *polymerase chain reaction* - PCR)
- Uporednom primenom fenotipskih i genotipskih metoda dokazati da fenotipske metode predstavljaju pouzdan test za detekciju karbapenemaza
- Utvrditi najčešće rezistotipove sojeva koji su rezistentni na karbapeneme

3 NAUČNO-RADNE HIPOTEZE

- Rezistencija na karbapeneme posredovana udruženim mehanizmima izmenjene ekspresije porina i hipersekrecijom β -laktamaza proširenog spektra delovanja (ESBL) i AmpC je najčešći mehanizam rezistencije enterobakterija na karbapeneme
- Produkcija karbapenemaza koje pripadaju vrstama NDM i OXA-48 predstavlja najčešći mehanizam enzimske rezistencije enterobakterija na karbapeneme
- Za rezistenciju na karbapeneme uslovljenu prisustvom β -laktamaza kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* najčešće su odgovorni enzimi iz grupe metalo- β -laktamaza
- Metode fenotipskog dokazivanja produkcije karbapenemaza predstavljaju pouzdan test za detekciju mehanizma rezistencije koji je posledica enzimske destrukcije karbapenema
- Prisustvo rezistencije na karbapeneme povezano je sa rezistencijom na druge klase antimikrobnih lekova

4 MATERIJAL I METODE

Bakterijski izolati

Identifikacija i selekcija

Ispitivanje je planirano kao prospektivna studija, i sprovedena je u periodu 1.1.2015.-1.5.2016. godine u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje u Nišu.

Izolacija i identifikacija bakterijskih izolata vršena je standardnim bakteriološkim metodama (morfološkim, kulturelnim i biohemijskim). Identifikacija do nivoa vrste izvršena je primenom automatizovanog sistema- Vitek 2 Compact sistem (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), ili BBL Crystal sistemom (Becton-Dickinson Microbiology Systems, USA).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 107 izolata vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* i 75 izolata vrste *Pseudomonas aeruginosa*, poreklom iz materijala bolesnika hospitalizovanih u Kliničkom Centru Niš.

Zastupljenost vrsta familije *Enterobacteriaceae* i poreklo izolata

U Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje u Nišu od 1.1.2015. do 1.5.2016. godine selektovano je 107 izolata enterobakterija koje su pokazale smanjenu osetljivost na jedan ili više karbapenema korišćenjem disk difuzione metode prema sledećim kriterijumima: zone inhibicije za ertapenem i meropenem <25mm a za imipenem <23mm.

Izolati su poticali iz različitih kliničkih materijala, uzetih od pacijenata hospitalizovanih u Kliničkom centru Niš tokom ispitivanog perioda.

Izolati sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme identifikovani su do nivoa vrste automatizovanim sistemom- Vitek 2 Compact sistemom (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), GN karticom sa pouzdanošću od najmanje 94%. U ispitivanje je uključen samo po jedan izolat iste vrste od jednog pacijenta. Po broju izolata, najzastupljenija je bila *K.pneumoniae* (78), zatim *E. cloacae* (11), *E.aerogenes* (devet), *P.mirabilis* (tri), *Morganella morganii* (dva), *C. freundii* (dva), *S. marcescens* (jedan) i *Escherichia coli* (jedan izolat).

Poreklo izolata prema vrsti uzorka. Izolati sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme poticali su iz različitih kliničkih materijala. Od 107 izolata sa smanjenom osetljivošću na

karbapeneme, najzastupljeniji su bili brisevi rana (47) i urin (22). Respiratornih uzoraka bilo je 19, sadržaja trbuha 12, tri izolata bila su iz krvi i četiri izolata iz drenažnog sistema.

Zastupljenost izolata enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na klinikama Kliničkog centra Niš

Više od polovine ispitivanih izolata (61,68%) potiče iz materijala bolesnika hospitalizovanih na hirurškim klinikama, pri čemu je najveći broj izolata poreklom iz materijala bolesnika hospitalizovanih na Klinici za opštu hirurgiju (34). Sa Klinike za kardiovaskularnu i transplantacionu hirurgiju bilo je 17 izolata, sa Klinike za infektivne bolesti 15, sa Klinike za neurohirurgiju 12, sa Klinike za urologiju 11, sa Klinike za nefrologiju devet, sa Klinike za kožne i polne bolesti pet i sa Klinike za ortopediju četiri izolata.

Zastupljenost vrste *Pseudomonas aeruginosa* i poreklo izolata

Poreklo izolata prema vrsti uzorka. Od 75 izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme, najveći broj je bio iz uzoraka rana (29), 14 je bilo iz endotrahealnih aspirata, a 11 izolata iz urina. Iz brisa traheostome bilo je pet, iz punktata četiri, iz brisa opekotine i sputuma po tri, iz krvi dva, a iz dijalizata, stolice, brisa uva i brisa rožnjače po jedan izolat.

Zastupljenost izolata *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na klinikama Kliničkog centra Niš

Ukupan broj izolata sa hirurških klinika Kliničkog centra Niš iznosio je 56% (42 od 75). Najveći broj izolata dobijen je iz uzoraka sa Klinike za neurohirurgiju (13). Sa Klinike za kardiovaskularnu i transplantacionu hirurgiju bilo je 11 izolata, sa Klinike za opštu hirurgiju 10, sa Klinike za infektivne bolesti 10, sa Klinike za urologiju osam, sa Klinike za interne bolesti sedam, sa Klinike za kožne i polne bolesti i Klinike za plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju po tri, sa Klinike za dečiju hirurgiju i ortopediju, Klinike za ortopediju i Klinike za dečije interne bolesti po dva, i po jedan izolat sa Klinike za plućne bolesti, Klinike za očne bolesti, Klinike za bolesti uha, grla i nosa i Klinike za ginekologiju i akušerstvo.

Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove

Disk difuziona metoda

Ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove određivano je standardnom disk-difuzionom metodom po Kirby-Baueru na Müller-Hinton agaru (Liofilchem, Italija). Izolati su inkubirani 24 sata na 35°C. Testiranje je vršeno Neo-Sensitabs tabletama (Rosco Diagnostica, Danska) na sledeće antimikrobne lekove: imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperacilin- tazobaktam (100µg/ 10µg), ceftazidim (30µg), cefepim (30µg), amikacin (30µg), gentamicin (10µg) i ciprofloksacin (5µg) za izolate vrste *Pseudomonas aeruginosa* i enterobakterije, a samo za enterobakterije i na ampicilin (10µg), amoksisilin-klavulanat (10µg), ertapenem (10µg), ceftriakson (30µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1,25/23,75 µg) u skladu sa preporukom Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl.- *Clinical Laboratory Standards Institute- CLSI*),²⁴⁷ a za kolistin (10µg) i tigeciklin (15µg) (samo za enterobakterije) prema protokolu EUCAST (engl.- *The European Committee on antimicrobial susceptibility testing*).²⁴⁸

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) Vitek 2 sistemom i MIC test trakom

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za antimikrobne lekove određivana je automatizovanim sistemom- Vitek2 Compact sistemom (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), karticama za ispitivanje osetljivosti Gram-negativnih bakterija na antibiotike- AST-N204 za enterobakterije i AST-N240 za *P.aeruginosa*. MIC test trakom (Liofilchem, Italija) za kolistin i tigeciklin izolati su testirani na Müller-Hinton agaru po preporuci proizvođača. Vrednost MIK izražena je u µg/ml. *E.coli* ATCC 25922 i *P.aeruginosa* ATCC 27853 korišćeni su za kontrolu kvaliteta testova za ispitivanje antimikrobne osetljivosti.

Multirezistentnim izolatima smatrani su oni koji su rezistentni na bar jednog predstavnika iz svake od najmanje tri grupe AML, a izolatima sa proširenom rezistencijom (engl.-*extended drug resistant- XDR*) izolati rezistentni na sve osim jedne ili dve grupe AML preporučenih za testiranje enterobakterija i vrste *P.aeruginosa*. Panrezistentnim izolatima (engl.-*pandrugresistant- PDR*) smatrani su izolati koji nisu osetljivi ni na jedan od trenutno raspoloživih AML za date bakterijske vrste.

Kriterijumi za selekciju izolata za testiranje fenotipskim metodama:

Sto sedam izolata enterobakterija i 75 izolata vrste *P.aeruginosa* je izdvojeno među izolatima koji su ispunili sledeće kriterijume:

- za enterobakterije disk difuzionom metodom zone inhibicije za ertapenem i meropenem <25mm, MIK >0,12µg/ml a za imipenem <23mm, MIK >1,0µg/ml²⁴⁸
- za vrstu *P.aeruginosa* MIK >8µg/ml za imipenem.⁸⁵

Ispitivanje produkcije karbapenemaza primenom genotipskih i fenotipskih metoda

Ovo istraživanje obuhvatilo je genotipsku detekciju rezistencije na karbapeneme (PCR metodom) i osam različitih fenotipskih testova za detekciju karbapenemaza, i to: Vitek 2 AES sistem, modifikovani Hodge-test (MHT), fenotipski test sinergizma za DPA, EDTA, kloksacilin i boroničnu kiselinu, testiranje osetljivosti na aztreonam disk difuzionom metodom, kombinovani disk test (CDT) -KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases (Rosco Diagnostica, Danska) za DPA, kloksacilin, boroničnu kiselinu i temocilin, MIC MBL test (Liofilchem, Italija), kolorimetrijski RAPIDEC® CARBA NP test (bioMérieux, Francuska) i hromogena podloga-chromID CARBA agar (bioMérieux). Prisustvo ESBL enzima vršeno je potvrdnim testom diskovima cefepim/cefepim-klavulanske kiseline (30/10µg), ceftazidim/ceftazidim- klavulanske kiseline (30/10 µg) i cefotaksim/cefotaksim- klavulanske kiseline (30/10 µg).

Metodom PCR testirano je 56 izolata enterobakterija i 14 izolata vrste *P.aeruginosa* odabranih upoređivanjem fenotipa rezistencije da bi se smanjila verovatnoća klonalnog porekla izolata.

Ispitivanje produkcije karbapenemaza primenom genotipskih metoda- detekcija karbapenemaza PCR metodom

Kod 56 izolata enterobakterija i 14 izolata vrste *P.aeruginosa* rezistentnih na karbapeneme je ispitano prisustvo gena koji kodiraju produkciju karbapenemaza primenom PCR metode: *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM} i *bla*_{NDM} gena koji kodiraju sintezu KPC, OXA-48, VIM i NDM enzima.^{249, 250} Uzimajući u obzir potrebu za jednostavnom interpretacijom (izbegavanje testiranja ampikona slične veličine u jednoj PCR tubi), kao i epidemiološku relevantnost testiranja

(kombinovanje enzima koji se najčešće zajedno pojavljuju u kliničkim izolatima), testirana su dva para prajmera- prvi, koji sadrži *bla*_{KPC} i *bla*_{VIM}, i drugi, koji sadrži *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48}. Parovi prajmera testirani su pojedinačno (*simplex* PCR)- umnožavanjem samo jednog gena, i kao *multiplex* PCR (umnožavanje datih parova gena).

Pozitivne kontrole dale su očekivanu dužinu fragmenata što je potvrdilo specifičnost korišćenih prajmera. U negativnoj kontroli nije detektovano umnožavanje genetskog materijala.

PCR metodologija

Ekstrakcija DNK

Tri kalibrisane eze (10 µL) testiranog izolata 24-satne kulture ispitivanih bakterija sa krvnog agara suspendovano je sa 2ml triptikaza-soja bujona (TSB) i kratko stavljeno na vorteks. Zatim je prebačeno 1400µl u mikroeprovete. Nakon toga izvršeno je centrifugiranje 5 minuta na 13000rpm. Supernatant je odbačen, a ostavljen talog. Talogu je dodavano je 200µl dejonizovane vode koja ne sadrži ribonukleaze (engl.- *RNAse free water*), a zatim je rastvoren na vorteksu. Mikroeprovete su ostavljane u termoblok ili vodeno kupatilo zagrejano na 100°C 5 minuta. Nakon toga su odmah prebacivane na hladni blok, na -20°C 6-7 min. Potom su centrifugirane 5 minuta na 13000 rpm. Supernatant, odnosno izolovana DNK u količini od 150µl prebacivana je u novu, odgovarajuće obeleženu mikroeprovetu. Istovremeno sa testiranjem uzoraka testirani su i referentni sojevi- pozitivne kontrole za sva četiri tipa karbapenemaza - tabela 4.1.

Tabela 4.1. Kontrolni sojevi korišćeni za optimizaciju multiplex PCR reakcije

Kontrolni soj	β-laktamaza gen	Karbapenemaza
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13440	<i>bla</i> _{VIM}	Metallo-β-laktamaza (VIM)
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13443	<i>bla</i> _{NDM-1}	Metallo-β-laktamaza (NDM-1)
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13438	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemaza (KPC)
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13442	<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 karbapenemaza
<i>E. coli</i> ATCC 25922		Negativna kontrola

Za umnožavanje *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} i *bla*_{KPC} korišćeni su prajmeri veličine oko 20 nukleotida (Microsynth- The Swiss DNA company) sekvenci prikazanih u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Sekvence prajmera

Prajmer	Sekvence nukleotida (5' - 3')	Ciljno mesto	Veličina produkta
<i>bla</i> _{KPC} FW	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	<i>bla</i> _{KPC}	798bp
<i>bla</i> _{KPC} RW	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
<i>bla</i> _{VIM} FW	GATGGTGTTTGGTCGCATA	<i>bla</i> _{VIM}	390bp
<i>bla</i> _{VIM} RW	CGAATGCGCAGCACCAG		
NDM-For	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	<i>bla</i> _{NDM}	621bp
NDM-Rev	GTAGTGCTCAGTGTCGGCAT		
OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	<i>bla</i> _{OXA}	744bp
OXA-48B	GAGCACTTCTTTGTGATGGC		

Oznake nukleotida: A- adenin, G-guanin, T-timin, C-citozin

PCR protokol

Komercijalni kit korišćen za amplifikaciju sadržavao je: PCR *buffer*, Taq polimerazu, jednake količine svakog dNTP-a (dNTP-dezoksiribonuleotidi) i MgCl₂ (*MasterMix*, *MyTaq Mix*, *Bioline*). Po 10nmol svakog prajmera stavlja se u mikroeprovete sa 2,5µl ekstrahovane DNK po uzorku. Dodavano je 50µl mastermiksa po uputstvu proizvođača. Sve je centrifugirano 5 sekundi i mikroeprovete su stavljene u aparat (Eppendorf Mastercycler, Nemačka) pri čemu je poklopac bio prethodno zagrejan na 104⁰C.

Za detekciju *bla*_{OXA-48} i *bla*_{VIM} amplifikacija je izvršena inicijalnom denaturacijom na 95⁰C 5 minuta, a zatim je sledilo 30 ciklusa koji su obuhvatali denaturaciju na 95⁰C 30 sekundi, zatim vezivanje prajmera na 58⁰C 30 sekundi i izduživanje na 58⁰C 30 sekundi. Poslednji stadijum bilo je konačno izduživanje na 72⁰C 3 minuta.

Za detekciju *bla*_{NDM} i *bla*_{KPC} umnožavanje je vršeno inicijalnom denaturacijom na 95⁰C 5 minuta, a zatim je sledilo 30 ciklusa koji su obuhvatali denaturaciju na 95⁰C 30 sekundi, zatim vezivanje prajmera na 60⁰C 30 sekundi i izduživanje na 72⁰C 30 sekundi. Poslednji stadijum bilo je konačno izduživanje na 72⁰C 3 minuta.

Elektroforeza PCR produkata

Produkti amplifikacije bili su bojeni etidijum bromidom (1%), a zatim su analizirani elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Migracija fragmenata vršena je u TBE puferu u trajanju od 100 minuta na 65-75V, a 20 minuta pred kraj na 80V. Paralelno sa uzorcima i kontrolama migrirao je i marker molekularnih težina (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder- Thermo Fisher) koji sadrži 20 fragmenata opsega 100bp.

Detekcija PCR produkata

Detektovanje i dokumentovanje prisustva amplifikovanih PCR produkata izvršeno je sistemom za profesionalnu dokumentaciju gelova (softver: BioDocAnalyze; digitalna kamera: Biometra, Göttingen, Nemačka).

Ispitivanje produkcije karbapenemaza primenom fenotipskih metoda

Vitek 2 Advanced Expert System (AES)

Korišćenjem N204 AST kartice za enterobakterije i AST N240 za *P.aeruginosa* ispitivani su mogući fenotipovi rezistencije.

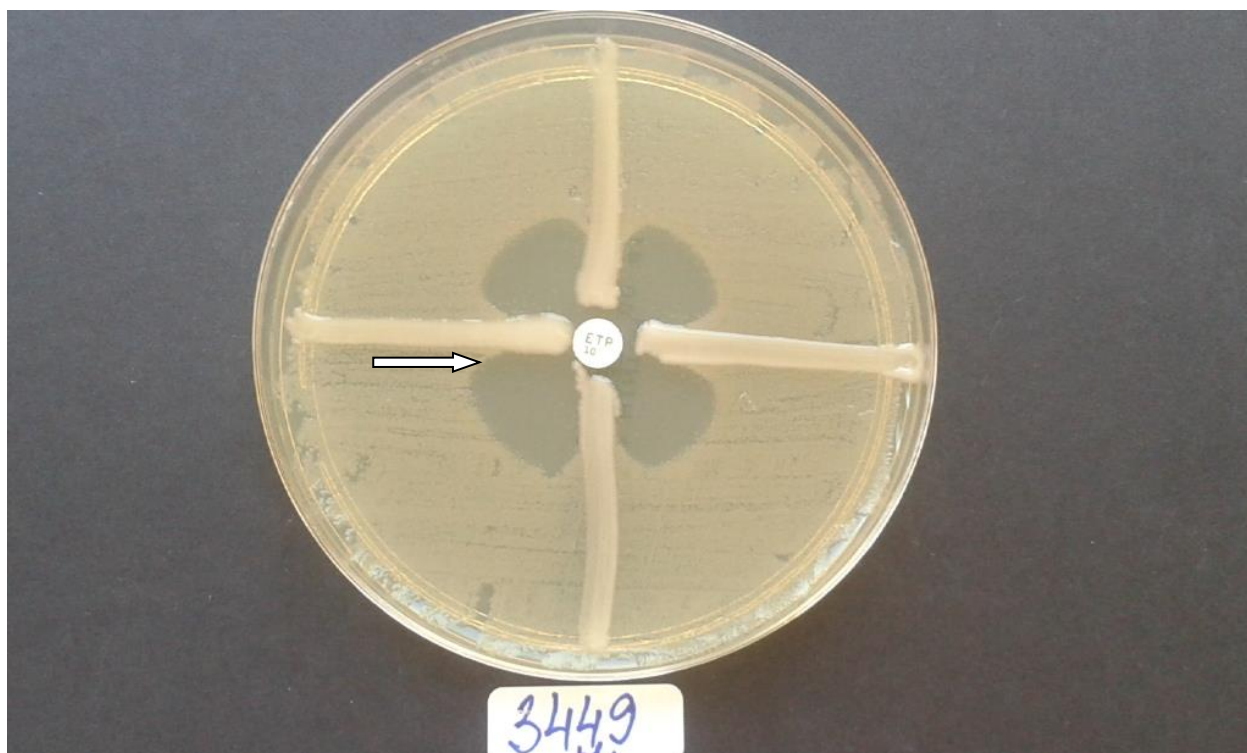
Vitek AES sistem (bioMerieux, Francuska) se bazira na preko 2000 različitih fenotipova i distribuciji oko 20000 MIK vrednosti. Testirani izolat podvrgava se analizi distribucije MIK i poređenju sa podacima iz baze. Ukoliko se identifikacija poklapa sa nekim od fenotipova rezistencije u bazi, AES sistem daće informaciju o mogućem fenotipu. Rezultati su interpretirani korišćenjem AES softvera VT2-R03.02. Komentari su podeljeni u osam grupa za β -laktamske antibiotike: nemutirani soj (engl.- *wild type*), stečene cefalosporinaze (engl.- *acquired cephalosporinase*), stečene penicilinaze (engl.-*acquired penicillinase*), nepropustljivost i β -laktamaza (engl.- *impermeability and β -lactamase*), karbapenemaze (engl.- *carbapenemase*), β -laktamaze proširenog spektra delovanja (engl.- *extended spectrum β -lactamases*- ESBL), visok nivo produkcije cefalosporinaza (engl.-*high-level cephalosporinase*- HLR), visok nivo urođenih penicilinaza (engl.-*high-level natural penicillinase*).

Modifikovani Hodge test (MHT)

Test je izvođen korišćenjem kontrolnog soja *E.coli* ATCC 25922 senzitivnim na karbapeneme. Inokulum gustine bakterijske suspenzije 0,5 McFarland standarda zasejavan je na

Müeller-Hinton agar. U centar ploče stavljan je disk ertapenema. Ispitivani sojevi zasejavani su ezom bez razblaženja direktno na podlogu od ivice Petrijeve šolje do diska ertapenema. Soj je tumačen pozitivnim na produkciju karbapenemaza ukoliko je pokazivao deformaciju zone inhibicije oko diska (tj. smanjenje zone inhibicije na mestu inokulacije ispitivanog soja). Pozitivnost testa rangirana je u četiri tipa: (1) negativan; (2) slabo pozitivan (+/-); (3) pozitivan (+); i (4) jako pozitivan (++) . Kao pozitivna kontrola korišćena je *K.pneumoniae* BAA 1705.

²⁵¹Modifikovani Hodge-test prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1. Modifikovani Hodge-test- deformacija zone na mestu inokulisanog soja

Fenotipski test sinergizma

Za dokazivanje karbapenemaza ovim testom korišćeno je istovremeno testiranje diska imipenema sa diskovima EDTA, dipikolonične kiseline (DPA), boronične kiseline i kloksacilina. Izolati gustine inokuluma 0,5 McFarland standarda zasejavani su na Müeller-Hinton agar. Disk imipenema od 10µg postavljan je na 7mm od navedenih diskova. Podloge su inkubirane 24 sata na 35°C. Pojava deformacije zone inhibicije oko diska imipenema (efekat sinergizma) ili pojava fantom zone između diska imipenema i bilo kog od ostalih testiranih diskova smatrana je

pozitivnim rezultatom.²⁵² Za kontrolu testa korišćeni su isti kontrolni sojevi kao kod PCR metode. Interpretacija fenotipskih testova sa inhibitorima prikazana je u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Interpretacija fenotipskih testova sa inhibitorima

MEHANIZAM REZISTENCIJE NA KARBAPENEME	SINERGIZAM				REZISTENCIJA	
	KARBAPENEM+ KLAVULANSKA KISELINA	KARBAPENEM+ KLOKSACILIN	KARBAPENEM+ BORONIČNA KISELINA	KARBAPENEM+ EDTA/ DIPIKOLINIČNA KISELINA	AZTREONAM 21mm	TEMOCILIN MIK $\geq 64 \mu\text{g/mL}$, $\leq 11\text{mm}$ ZONA OKO DISKA 30 μg
ESBL ili AmpC+ gubitak porina	+/-	+/-	+/-	-	R	-
MBL (VIM, NDM)	-	-	-	+++	S	++
KPC	+/-	-	+++	-	R	+/-
OXA-48	-	-	-	-	S	+++

+++ (jako pozitivan), ++ (pozitivan), +/- (slabo pozitivan), - (negativan); S-senzitivan, R-rezistentan

Testiranje diskom temocilina i aztreonama

Rezistencija na temocilin disk 30 μg $\leq 11\text{mm}$ bez prisutnog sinergizma sa DPA/EDTA ukazivala je na prisustvo OXA-48 enzima a osetljivost na disk aztreonama 30 μg uz pozitivne testove na DPA i EDTA na prisustvo MBL.

Kombinovani disk test (CDT)

Za kombinovani disk test korišćen je KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases (Rosco Diagnostica, Danska). Disk meropenema od 10 μg postavljan je na 30mm od diskova meropenem/dipikolonične kiseline, meropenem/boronične kiseline, meropenem/kloksacilina i temocilina i posle inkubacije od 24 sata na 35⁰C merena je zona inhibicije za svaki od testiranih diskova. Interpretacija CDT testa za ostale prikazana je u tabeli 4.4.²⁴⁸ Kod temocilina su pozitivnim smatrani izolati kod kojih je detektovana rezistencija na temocilin ($\leq 12\text{mm}$) ukoliko nije postojala razlika u zoni inhibicije veća od 3mm između meropenema i kombinacije meropenema sa DPA, kloksacilinom i boroničnom kiselinom. Kod CDT

testa sa EDTA, razlika u zoni ≥ 7 mm za imipenem/ imipenem-EDTA(10 μ g/750 μ g) kombinovani disk metod smatrana je pozitivnim rezultatom. Tumačenje testa dato je u tabeli 4.4.

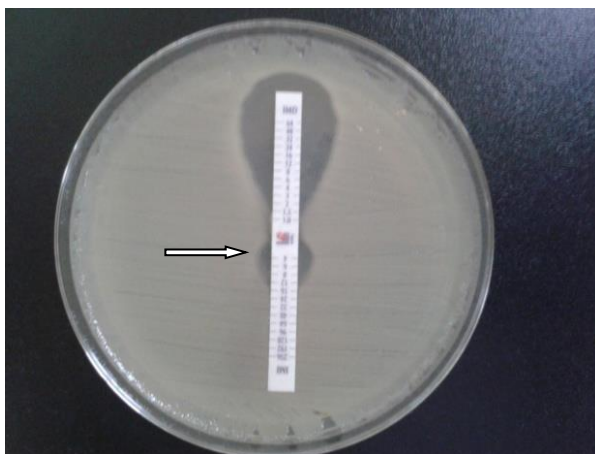
Tabela 4.4 Interpretacija KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases testa

		MRPBO	MRPDP	MRPCX	Temocilin30 μ g
AmpC+ gubitak porina	MRP10	≥ 4 mm i	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 12 mm
ESBL* + gubitak porina	MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12 mm
KPC	MRP10	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Varijabilno
	MRPCX	≥ 4 mm	-	-	-
MBL	MRP10	< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	Varijabilno
OXA-48	MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Bez zone inhibicije
OXA-48/ESBL*	MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Bez zone inhibicije

*Pozitivan DDT test; MRP10 - Meropenem 10 μ g; MRPBO- meropenem + fenilboronična kiselina; DPA MRPDP-meropenem+dipikolinična kiselina; MRPCX- meropenem+kloksacilin

Test traka za dokazivanje metalo β -laktamaza -MIC MBL test traka

Dokazivanje metalo- β -laktamaza MIC MBL-test trakom zasnovano je na inhibiciji ovih enzima dejstvom EDTA. Test traka MBL MIC (Liofilchem, Italy) sadrži na jednom kraju imipenem (IMI) (4-256 μ g/mL) a na drugom imipenem/EDTA (IMD) (1-64 μ g/mL). Za fenotipsko testiranje prisustva MBL korišćena je prema uputstvu proizvođača. Količnik MIK vrednosti IMI/IMD > 8 μ g/ml, deformacija zone ili pojava fantom zone bili su pokazatelj potencijalne produkcije MBL.²⁵³ Test traka za dokazivanje metalo β -laktamaza- MIC MBL test traka prikazana je na slici 4.2.

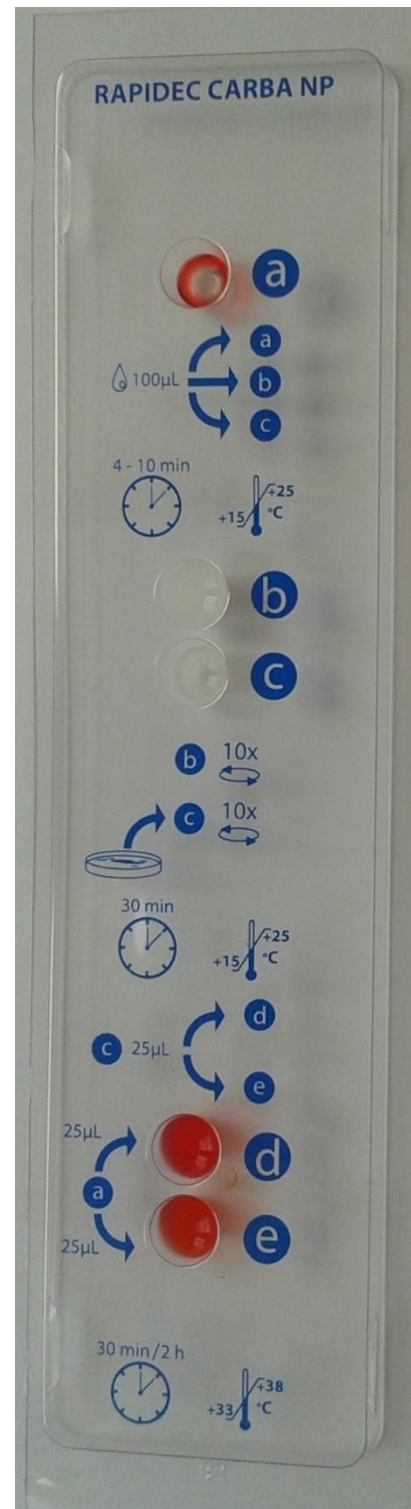
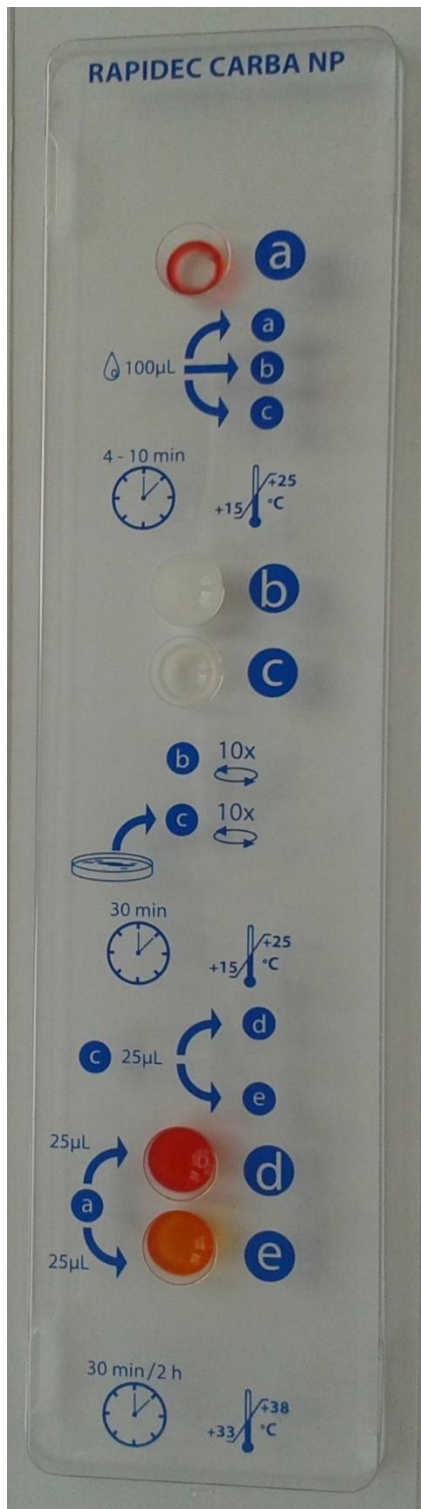


Slika 4.2. Pozitivan MIC MBL test- količnik MIK IMI/IMD 256/1,5, pojava „fantom“ zone

Kolorimetrijski test za dokazivanje karbapenemaza (Carba NP)

Kolorimetrijski test za dokazivanje karbapenemaza je klasični acidometrijski penicilinaza test i ima kolorimetrijski završetak (fenol red indikator prelazi u žuto kod hidrolize karbapenema).

Za kolorimetrijsko dokazivanje karbapenemaza korišćen je komercijalni RAPIDEC® CARBA NP test (bioMerieux, Francuska). Test služi za brzu detekciju karbapenemaza kod Gram-negativnih bakterija kao što su *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* i *A. baumannii*. Test se bazira na detekciji hidrolize β -laktamskog prstena molekula imipenema. Hidroliza dovodi do acidifikacije medijuma što izaziva promenu boje pH indikatora (fenol red) vidljive golim okom. Rezultati se očitavaju posle 30 minuta i posle dva sata. Odsustvo promene boje posle dva sata značilo je negativan rezultat.²⁵⁴ Kolorimetrijski test za dokazivanje karbapenemaza prikazan je na slici 4.3.



Pozitivan test:

- komora *d*- kontrolna -crvena
- komora *e*- ispitivani soj-promena boje u žutu

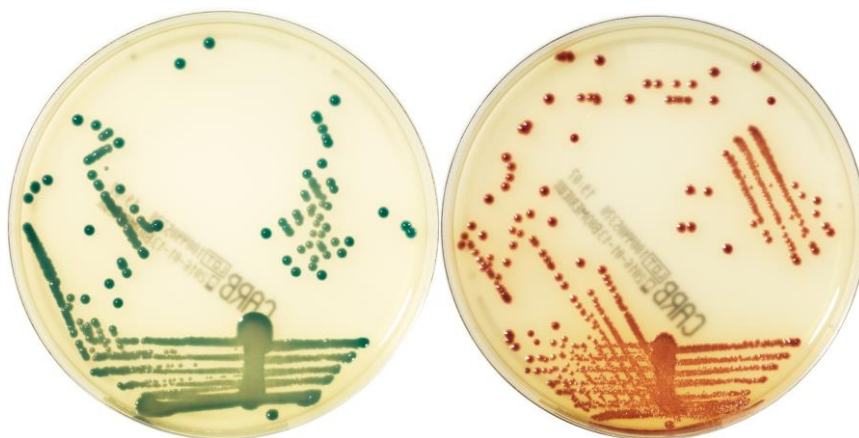
Negativan test:

- komora *d* -kontrolna -crvena
- komora *e*- ispitivani soj-bez promene boje

Slika 4.3. Kolorimetrijski test za dokazivanje karbapenemaza (RAPIDEC® CARBA NP test)

Detekcija produkcije karbapenemaza pomoću hromogenih podloga (chromID CARBA agar)

Sto sedam izolata iz porodice *Enterobacteriaceae* i 75 izolata *Pseudomonas aeruginosa* testirano je primenom chromID CARBA agara (bioMerieux, France) koji sadrži hranljivu bazu i hromogeni supstrat koji omogućava detekciju karbapenemaza kod različitih Gram-negativnih bakterija- *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, proteus grupe i *P.aeruginosa* kao i inkorporiranu odgovarajuću kombinaciju karbapenema za selekciju bakterija rezistentnih na karbapeneme.²⁵⁵ Svi ispitivani izolati zasejani su i inkubirani 20 sati na 37⁰C. Karbapenemaza pozitivni izolati pokazali su tipičan porast prema uputstvu proizvođača: *E. coli* (tamnocrvene kolonije) a *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* i *Citrobacter sp.* plavo-zelene do plavo-sivo prebojene kolonije. Karbapenemaza negativni izolati nisu rasli na ovim podlogama ili je porast bio vrlo oskudan. Izgled kolonija na hromogenom agaru prikazan je na slici 4.



Slika 4.4. Prikaz porasta na hromogenom agaru: levo- plavo-zelena- *K.pneumoniae*; desno- crvena-*E. coli*

Statistička obrada podataka

Validnost fenotipskih testova analizirana je i izražena kroz senzitivnost i specifičnost u poređenju sa PCR metodom za detekciju gena rezistencije kao zlatnim standardom. Određena je osetljivost (broj karbapenemaza pozitivnih izolata koji su korektno identifikovani) i specifičnost (broj karbapenemaza negativnih izolata koji su korektno diferencirani) za svaku od upotrebljenih metoda.

Senzitivnost je bazirana na odnosu $a/(a + c)$, gde “a” predstavlja broj izolata koji su korektno identifikovani kao produktori karbapenemaza datim testom a “c” predstavlja broj stvarno pozitivnih izolata koji su testom pogrešno identifikovani kao lažno negativni. Specifičnost je izračunata na osnovu odnosa $d/(b + d)$, gde je “d” broj negativnih izolata korektno identifikovan korišćenim testom a “b” broj izolata koji su pogrešno identifikovani kao produktori karbapenemaza (lažno pozitivni). Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost predstavljena je prema $a/(a + b)$ i $d/(c + d)$.²⁵⁶

Rezultati istraživanja prikazani su tabelarno, grafički i fotografijama. Podaci su prikazani po pravilima deskriptivne statistike, a provera hipoteza vršena je odgovarajućim testovima u statističkom programu MedCalc - https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php.

5. REZULTATI

5.1. Analiza izolata familije *Enterobacteriaceae* genotipskim i fenotipskim metodama

5.1.1 Rezultati ispitivanja osjetljivosti enterobakterija na antimikrobne lekove

5.1.1.1 Osetljivost enterobakterija na antimikrobne lekove određena disk-difuzionom metodom

Ispitivanjem osjetljivosti 107 enterobakterija koje su pokazale smanjenu osjetljivost na karbapeneme na antimikrobne lekove standardnom disk-difuzionom metodom po Kirby-Baueru dobijeni su rezultati iskazani kao broj senzitivnih (S), intermedijarno osjetljivih (I) i rezistentnih (R) izolata. Rezultati ispitivanja osjetljivosti na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom dati su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Osetljivost enterobakterija sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme na antimikrobne lekove testirana disk difuzionom metodom

Naziv antimikrobnog leka	Osetljivost		
	R	I	S
Ampicilin	107	0	0
Amoksisicilin/klavulanska kiselina	107	0	0
Ceftriakson	107	0	0
Ceftazidim	107	0	0
Piperacilin/tazobaktam	105	1	2
Cefepim	104	0	3
Ertapenem	104	1	2
Ciprofloksacin	99	0	8
Trimetoprim-sulfametoksazol	93	5	9
Gentamicin	91	0	16
Meropenem	89	4	14
Imipenem	58	25	24
Amikacin	32	4	71

Senzitivni (S), intermedijarno osjetljivi (I) i rezistentni (R)

Disk difuzionom metodom 58 (54,20%) izolata bilo je rezistentno, 25 (23,36%) intermedijarno osetljivo i 24 (22,42%) senzitivno na imipenem, 89 (83,17%) izolata bilo je rezistentno, četiri (3,73%) intermedijarno osetljivo i 14 (13,08%) senzitivno na meropenem a 104 (97,19) izolata bilo je rezistentno, jedan (0,93%) intermedijarno osetljiv i dva (1,86%) senzitivna na ertapenem. Svi izolati bili su rezistentni na ampicilin, amoksicilin- klavulansku kiselinu, ceftriakson i ceftazidim. Od ostalih AML najveća rezistencija zabeležena je na ciprofloksacin 99 (92,52%). Svih 107 izolata bilo je multirezistentno.

5.1.1.2 Osetljivost enterobakterija na antimikrobne lekove određena minimalnom inhibitornom koncentracijom Vitek 2 sistemom

Minimalna inhibitorna koncentracija antimikrobnih lekova određena je Vitek2 Compact sistemom, AST-N204 karticom za ispitivanje osetljivosti Gram-negativnih bakterija na antibiotike prema važećim CLSI kriterijumima, i rezultati su prikazani u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Osetljivost enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na antimikrobne lekove određena Vitek2 sistemom

Naziv antimikrobnog leka	Osetljivost		
	R	I	S
Ampicilin	107	0	0
Amoksicilin-klavulanska kiselina	107	0	0
Cefotaksim	107	0	0
Ceftazidim	107	0	0
Cefepim	104	0	3
Piperacilin- tazobaktam	104	1	2
Ertapenem	104	0	3
Ciprofloksacin	99	0	8
Gentamicin	91	0	16
Trimetoprim-sulfametoksazol	90	5	12
Meropenem	86	0	21
Imipenem	56	27	24
Amikacin	32	4	71

Senzitivni (S), intermedijarno osetljivi (I) i rezistentni (R)

Na osnovu vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija određenih Vitek2 sistemom 56 (52,33%) izolata bilo je rezistentno, 27 (25,23%) intermedijarno osetljivo i 24 (22,42%) senzitivno

na imipenem, 86 (80,37%) izolata bilo je rezistentno, nije bilo intermedijarno osetljivih izolata i 21 (19,62%) izolat je bio senzitivna na meropenem. Na ertapenem je 104 (97,19) izolata bilo rezistentno, nije bilo intermedijarno osetljivih izolata i tri (2,8%) izolata su bila senzitivna. Svi izolati bili su rezistentni na ampicilin, amoksicilin- klavulansku kiselinu, cefotaksim i ceftazidim. Od ostalih AML najveća rezistencija zabeležena je kod ciprofloksacina- 99 izolata (92,52%). Svih 107 izolata bilo je multirezistentno (MDR).

Osetljivost na kolistin i tigeciklin određena je MIK testom, i dobijeni su sledeći rezultati: svi testirani sojevi bili su osetljivi na tigeciklin, dok je na kolistin bilo 18 (16.36%) rezistentnih izolata.

5.1.2 Fenotipovi rezistencije kod enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

Najčešći fenotipovi rezistencije bili su: izolati rezistentni na sve testirane AML osim kolistina i tigeciklina (17,27%); izolati rezistentni na sve testirane AML osim tigeciklina, amikacina i fosfomicina i intermedijarni na imipenem (16,36%) i izolati rezistentni na sve testirane AML osim kolistina, tigeciklina, fosfomicina i amikacina (14,55%). Svi fenotipovi prikazani su u tabeli prikazani su u tabeli 5.3.

Tabela 5.3. Najčešći fenotipovi rezistencije enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

AMP	AMC	CTX	TZP	CAZ	FEP	ETP	IMP	MEM	GM	AK	CIP	NOR	FOS	TS	CS	TGC	Broj izolata	% izolata
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S/R	R	S	S	19	17.27
R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	R	R	S	18	16.36
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	16	14.55
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	4	3.64
R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S/R	R	S	S	6	5.45
R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S/R	R	S	S	5	4.55
R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S/R	R	S	S	4	3.64
R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	4	3.64
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S/R	R	S	S	2	1.82
Ostali fenotipovi rezistencije																	29	29.09
Ukupno																	107	100

AMP: ampicilin, AMC: amoksicilin-klavulanska kiselina, CTX: cefotaksim, TZP: piperacilin/tazobaktam, CAZ: Ceftazidim, FEP: cefepim, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, GM: gentamicin, AK: amikacin, CIP: ciprofloksacin, NOR: norfloksacin, FOS: fosfomicin, TS: trimetoprim- sulfametoksazol, CS: kolistin, TGC: tigeciklin

S-senzitivan; R-rezistentan; S/R-dati fenotip obuhvata obe kategorije za fosfomicin

Analizom datih 107 izolata upoređivani su markeri rezistencije da bi se smanjila verovatnoća klonalnog porekla izolata. Na osnovu toga, za dalju analizu izdvojeno je 56 izolata, čija je zastupljenost prema bakterijskim vrstama prikazana na tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Zastupljenost izolata prema bakterijskim vrstama

Naziv bakterije	Broj izolata
<i>K.pneumoniae</i>	35
<i>E.cloacae</i>	11
<i>S.marcescens</i>	3
<i>E. aerogenes</i>	2
<i>C. freundii</i>	2
<i>E.coli</i>	1
<i>M.morganii</i>	1
<i>P.mirabilis</i>	1
Ukupno	56

Osetljivost na antimikrobne lekove za ove izolate izražena kao MIK vrednost određena je AST N204 karticom Vitek2 sistema, a S/I/R kategorije definisane su prema CLSI kriterijumima, izuzev za kolistin i tigeciklin, gde su granične vrednosti preuzete iz EUCAST-a. Rezultati su prikazani na tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Distribucija MIK ($\mu\text{g/ml}$) vrednosti određenih VITEK 2 AES sistemom

Naziv bakterije	Broj izolata	Naziv antimikrobnog leka									
		FEP	ETP	MEM	IMP	AK	GM	CIP	TS	CS	TGC
<i>K.pneumoniae</i>	2	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	6	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	2	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>Enterobacter sp.</i>	2	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	1	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	2	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	8	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>C. freundii</i>	2	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.75
<i>Enterobacter sp.</i>	3	16	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.75
<i>Enterobacter sp.</i>	1	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	2	≥ 4	≥ 320	1	1
<i>K.pneumoniae</i>	1	2	≥ 8	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.75	0.75
<i>Enterobacter sp.</i>	2	2	≥ 8	≥ 16	≥ 16	16	≥ 16	0.25	≤ 20	4	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	7	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.75	1
<i>K.pneumoniae</i>	4	≥ 64	≥ 8	4	≥ 16	8	≤ 1	≥ 4	≥ 320	0.75	0.75
<i>Enterobacter sp.</i>	1	16	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≤ 2	≤ 1	1	≥ 320	0.5	1
<i>Enterobacter sp.</i>	3	≥ 64	4	0.25	0.25	16	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>Enterobacter sp.</i>	1	≥ 64	4	1	0.25	8	≥ 16	≥ 4	40	0.5	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	1	≥ 64	4	1	0.25	≤ 2	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	1	≥ 64	≥ 8	1	0.25	≤ 2	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>K.pneumoniae</i>	1	≥ 64	≥ 8	1	0.25	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	1
<i>M. morgani</i>	1	≥ 64	1	1	4	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	/	0.75
<i>S.marcescens</i>	1	≥ 64	8	0.5	1	2	1	0.5	320	0.5	0.5
<i>S.marcescens</i>	2	≥ 64	2	0.5	1	2	1	0.5	320	0.5	0.75
<i>K.pneumoniae</i>	14	≥ 64	≥ 8	≥ 16	2	8	≥ 16	≥ 4	40	6	0.75
<i>E.coli</i>	1	≥ 64	≥ 8	≥ 16	≥ 16	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	0.5	0.5
<i>P. mirabilis</i>	1	≥ 64	1	1	8	≥ 64	≥ 16	≥ 4	≥ 320	/	0.5
<i>Ukupno</i>	56										

FEP: cefepim, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, GM: gentamicin, AK: amikacin, CIP: ciprofloksacin, TS: trimetoprim-sulfametoksazol, CS:kolistin, TGC:tigeciklin

Analiza antimikrobne osetljivosti ove grupe je dala sledeće rezultate:

-penicilini i cefalosporini: svi izolati bili su rezistentni na ampicilin, amoksicilin-klavulansku kiselinu, cefotaksim, ceftazidim i piperacilin-tazobaktam; samo tri izolata bila su osetljiva na cefepim, jedan rezistentan sa niskom vrednošću MIK(16 μ g), a ostalih 50 je bilo rezistentno sa visokom vrednošću MIK (\geq 64 μ g).

-karbapenemi: na imipenem je bilo osam senzitivnih, 14 intermedijarno osetljivih i 32 rezistentna izolata, od kojih je 30 (93,75%) bilo sa visokom vrednošću MIK na ovaj antibiotik (\geq 16 μ g); na meropenem je bilo 10 senzitivnih i 44 rezistentna od kojih je 43 (97,72%) bilo sa visokom vrednošću MIK (svi osim jednog izolata imali su MIK \geq 16 μ g); na ertapenem su bila dva intermedijarno osetljiva i 52 rezistentna izolata od kojih je 47 (90,38%) bilo sa visokom vrednošću MIK (svi osim pet izolata imali su MIK \geq 8).

-aminoglikozidi: kod amikacina je bilo 36 senzitivnih izolata i 18 rezistentnih, kod kojih su svi imali MIK \geq 64 μ g; kod gentamicina je bilo sedam senzitivnih, jedan intermedijarno osetljiv i 46 rezistentnih, i svi su imali MIK \geq 16 μ g.

-hinoloni: sedam izolata bilo je osetljivo na ciprofloksacin, a ostalih 50 bilo je rezistentno (MIK \geq 4 μ g).

- trimetoprim- sulfametoksazol - svi izolati pokazali su rezistenciju na ovaj antimikrobni lek

-Tigeciklin- nije bilo izolata rezistentnih na tigeciklin

-Kolistin: osamnaest izolata bilo je rezistentno na kolistin.

Svi ispitivani izolati bili su multirezistentni. Ukupno četiri izolata bila su senzitivna samo na dva AML koja se koriste u terapiji (dva na tigeciklin i fosfomicin i dva na tigeciklin i amikacin- ekstremno rezistentni izolati). Nije bilo panrezistentnih izolata.

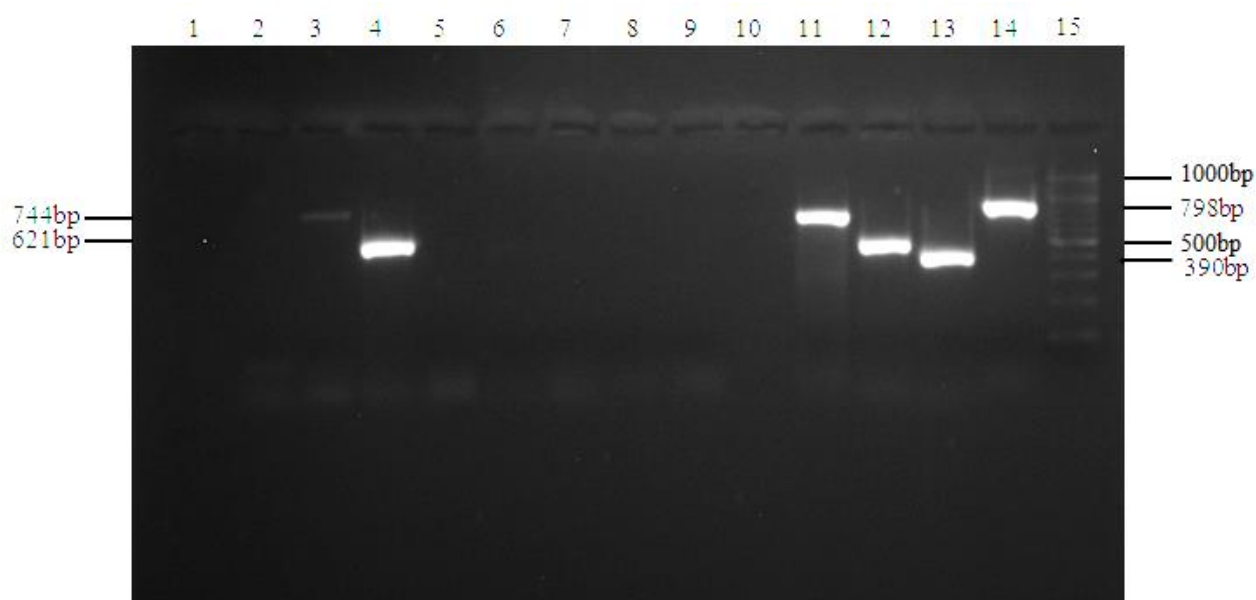
5.1.3. Rezultati genotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod enterobakterija

5.1.3.1. Zastupljenost gena koji kodiraju sintezu karbapenemaza PCR metodom

Od genotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza korišćen je *simplex* i *multiplex PCR*, sa prajmerima za detekciju *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena.

Na slikama 5.1-5.8. prikazana je elektroforeza PCR produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena. Dužina svakog amplicona označena je sa desne i/ili leve strane slike.

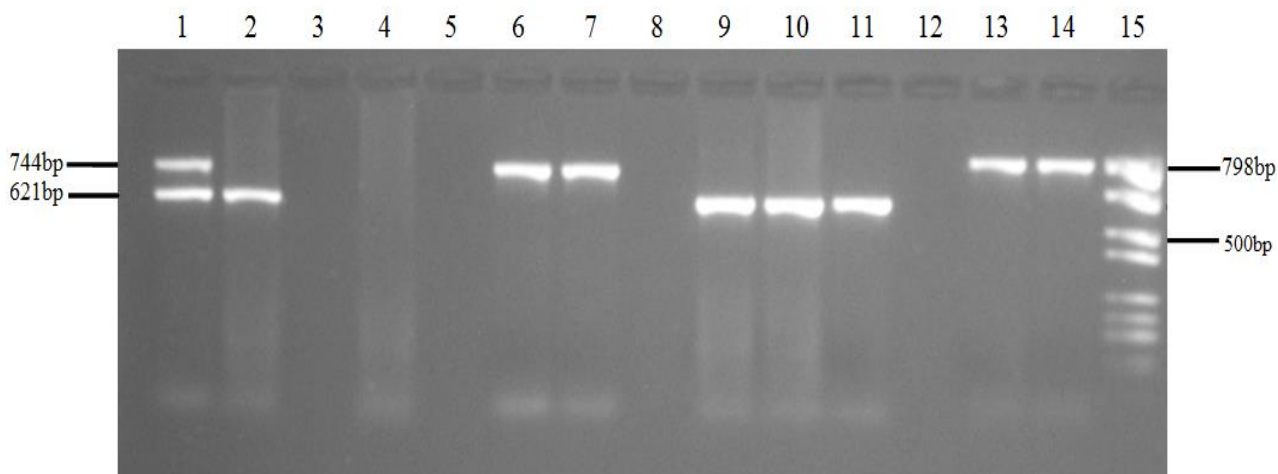
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena prikazana je na slici 5.1.



Slika 5.1. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena kod referentnih sojeva

4- izolat *K.pneumoniae*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{NDM-1} gena- 621bp;11- *K.pneumoniae* NCTC 13443- pozitivna kontrola za *bla*_{OXA-48} gen744bp ;12- *K.pneumoniae* NCTC 13442 -pozitivna kontrola za *bla*_{NDM-1} gen 621bp;13- *K.pneumoniae* NCTC 13440- pozitivna kontrola za *bla*_{VIM} gen-390bp;14- *K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla*_{KPC} gen 798bp;15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder) koji sadrži 20 fragmenata opsega 100bp.

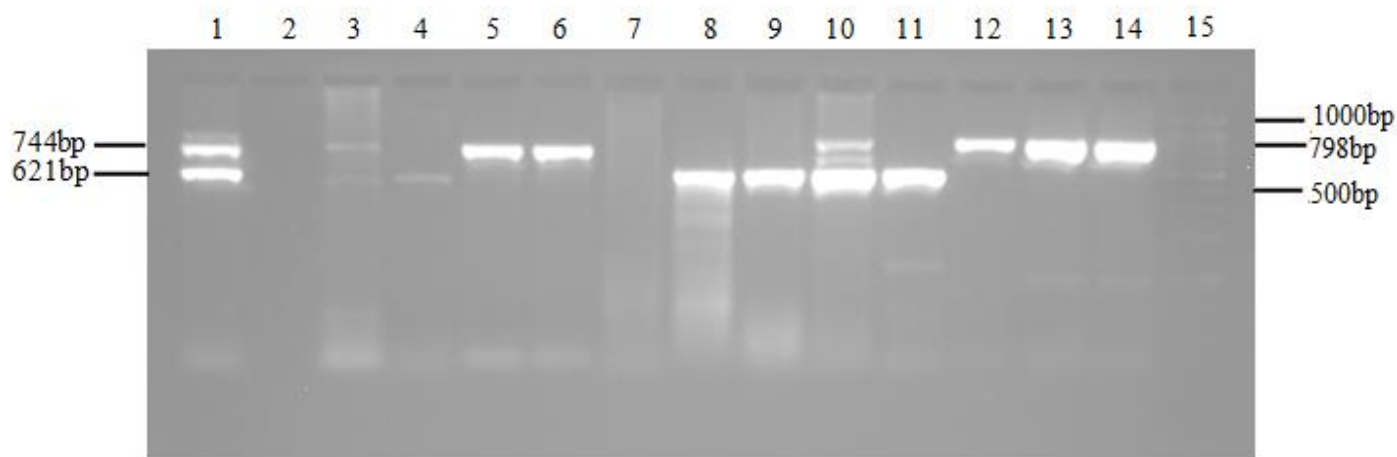
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena prikazana je na slici 5.2.



Slika 5.2. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena

1- izolat *E. aerogenes*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{OXA-48} gena- 744bp i *bla*_{NDM-1} gena- 621bp; 2-*K.pneumoniae* NCTC 13442 -pozitivna kontrola za *bla*_{NDM-1} gen - 621bp;6-*K.pneumoniae* NCTC 13443- pozitivna kontrola za *bla*_{OXA-48} gen -744bp;7- izolat *K.pneumoniae*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{OXA-48} gena -744bp; 9,10,11- izolati *E.coli*, *S. marcescens* i *M. morganii* kod kojih su dokazani fragmenti *bla*_{NDM-1} gena- 621bp; 13- izolat *K.pneumoniae*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{KPC} gena-798bp; 14- *K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla*_{KPC}-gen798bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

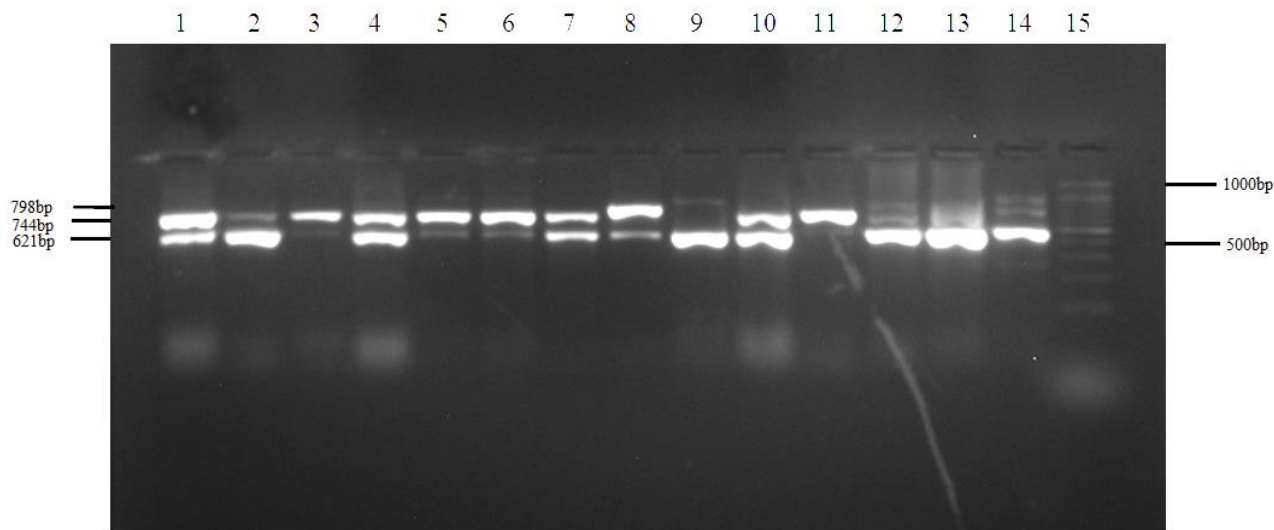
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena prikazana je na slici 5.3.



Slika 5.3. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena (*multiplex* PCR)

1- izolat *E. aerogenes*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{OXA-48} gena -744bp i *bla*_{NDM-1} gena - 621bp; 5- izolat *K.pneumoniae*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{OXA-48} gena -744bp; 6- *K.pneumoniae* NCTC 13443- pozitivna kontrola za *bla*_{OXA-48} gen744bp; 8,9,10- izolati *E.coli*, *S. marcescena* i *M. morgani* kod kojih su dokazani fragmenti *bla*_{NDM-1} gena- 621bp; 11- *K.pneumoniae* NCTC 13442 -pozitivna kontrola za *bla*_{NDM-1} gen- 621bp; 12- Izolat *E. cloacae*, kod koga su dokazani fragmenti *bla*_{KPC} gena-798bp; 13- *K.pneumoniae* BAA 1705- pozitivna kontrola za *bla*_{KPC}-798bp; 14-*K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla*_{KPC} gen798bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

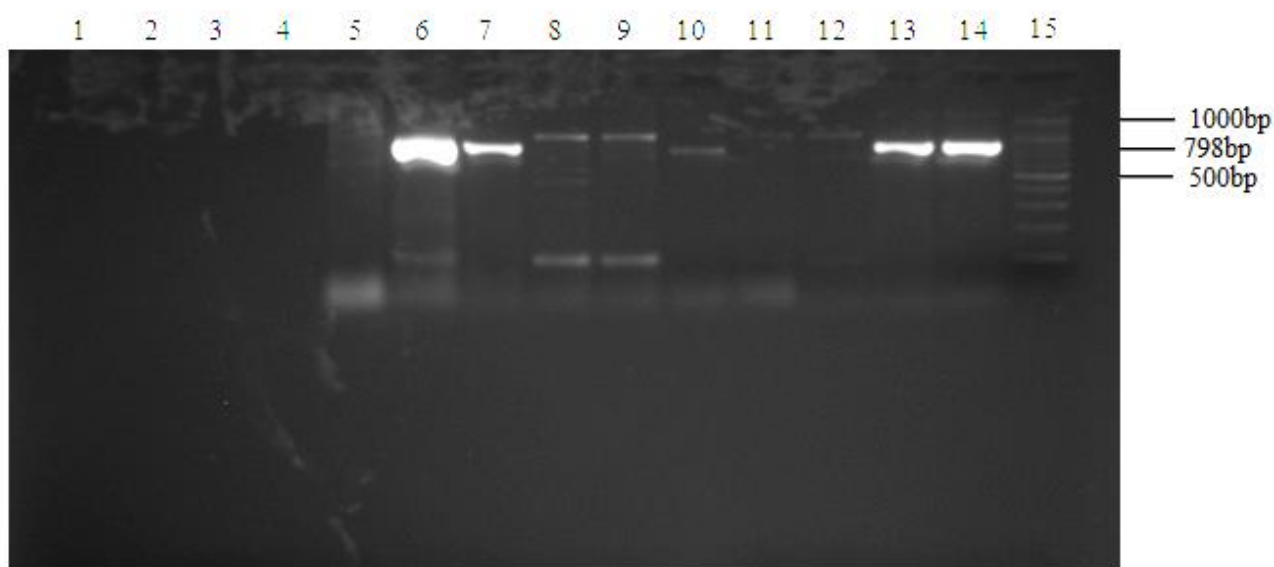
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{NDM}* gena, *bla_{KPC}* gena i *bla_{OXA-48}* gena (*multiplex PCR*) prikazana je na slici 5.4.



Slika 5.4. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{NDM}* gena, *bla_{KPC}* gena i *bla_{OXA-48}* gena (*multiplex PCR*)

1,2,4,7- izolati *K.pneumoniae* kod kojih su dokazani fragmenti *bla_{OXA-48}* gena -744bp i *bla_{NDM-1}* gena - 621bp; 3,5,6 -izolati *K.pneumoniae* kod kojih su dokazani fragmenti *bla_{OXA-48}* gena.-744bp;8- izolat *K.pneumoniae* kod kojih su dokazani fragmenti *bla_{NDM-1}* gena - 621bp i *bla_{KPC}* gena- 798bp; 9,12,13- izolati *K.pneumoniae*, *C. freundii* i *E. aerogenes* kod kojih su dokazani fragmenti *bla_{NDM-1}* gena- 621bp;10- izolat *E. cloacae* kod koga su dokazani fragmenti *bla_{OXA-48}* gena -744bp i *bla_{NDM-1}* gena - 621bp; 11- *K.pneumoniae* NCTC 13442 -pozitivna kontrola za *bla_{OXA-48}* gen-744bp; 14- *K.pneumoniae* NCTC 13443- pozitivna kontrola za *bla_{NDM-1}* gen-621bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase(O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

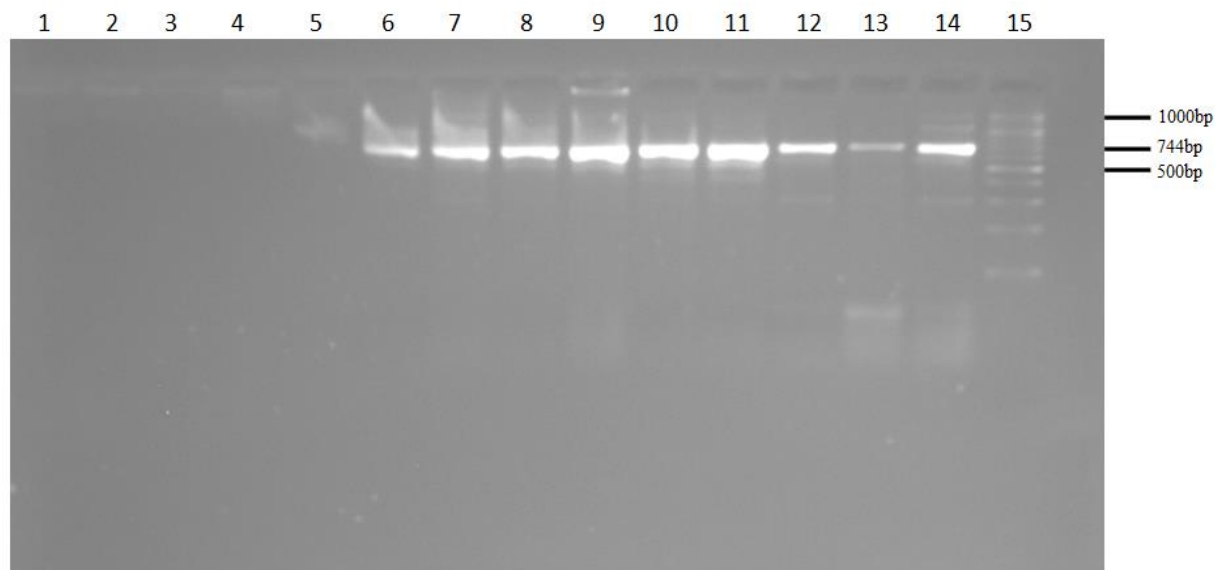
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{KPC}* gena prikazana je na slici 5.5.



Slika 5.5. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{KPC}* gena

6,7 Izolati *K.pneumoniae* i *E. cloacae* kod kojih su dokazani fragmenti *bla_{KPC}* gena.-798bp; 13- *K.pneumoniae* BAA 1705- pozitivna kontrola za *bla_{KPC}* gen- 798bp; 14- *K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla_{KPC}* gen-798bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O' Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

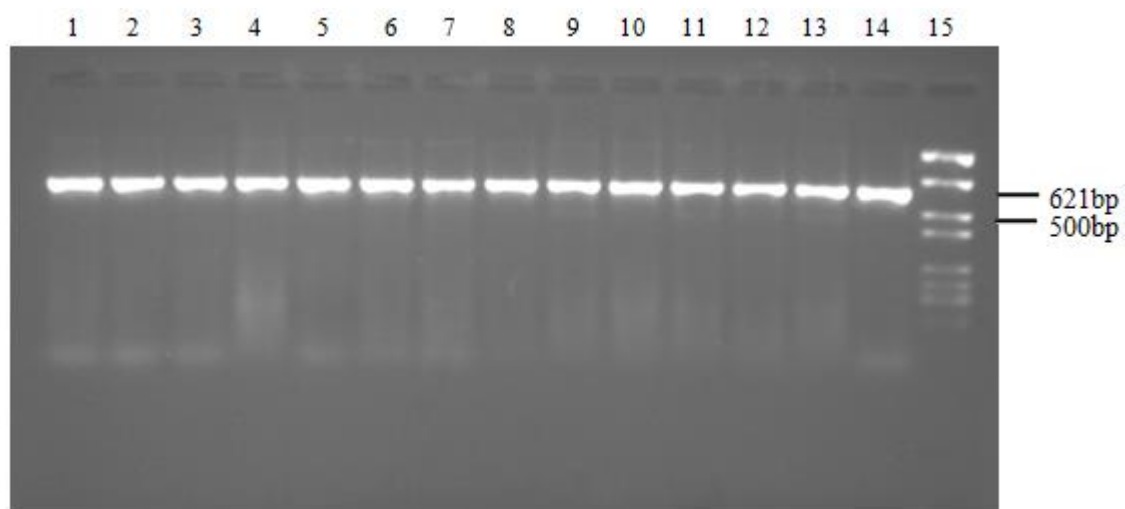
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{OXA-48} gena prikazana je na slici 5.6.



Slika 5.6. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{OXA-48} gena

6-13 izolati *K.pneumoniae*, kod kojih su dokazani fragmenti *bla*_{OXA-48} gena -744bp; 14- *K.pneumoniae* NCTC 13443- pozitivna kontrola za *bla*_{OXA-48} gen -744bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O' Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

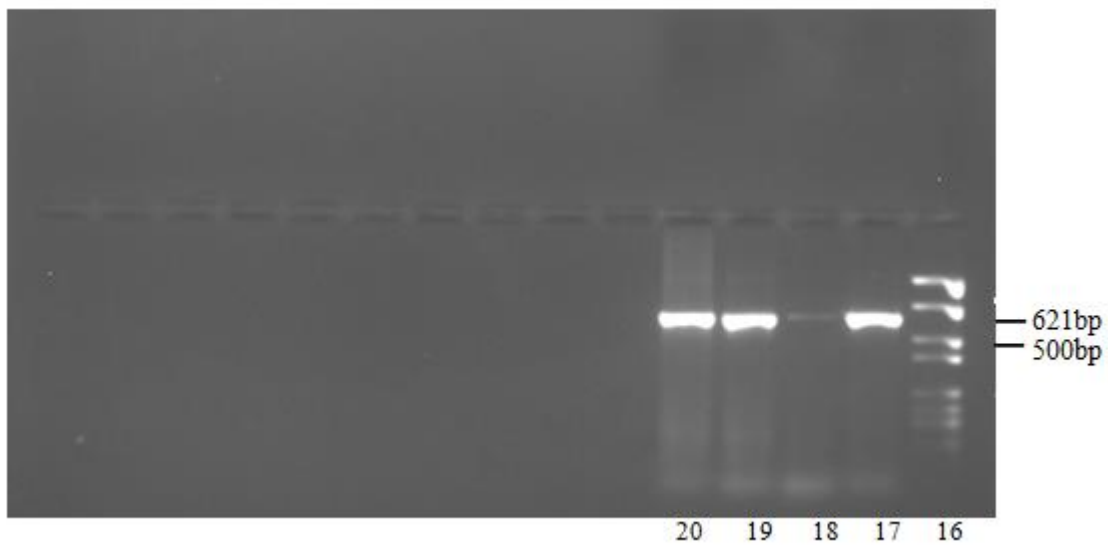
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja bla_{NDM} gena prikazana je na slici 5.7.



Slika 5.7. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja bla_{NDM} gena

1-13-izolati *K.pneumoniae* kod kojih je dokazano prisustvo bla_{NDM} gena- 621bp; 14-*K.pneumoniae* NCTC 13442 - pozitivna kontrola za bla_{NDM-1} gen- 621bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase je pUC 19 DNA- Sau 3 A (Ambion)

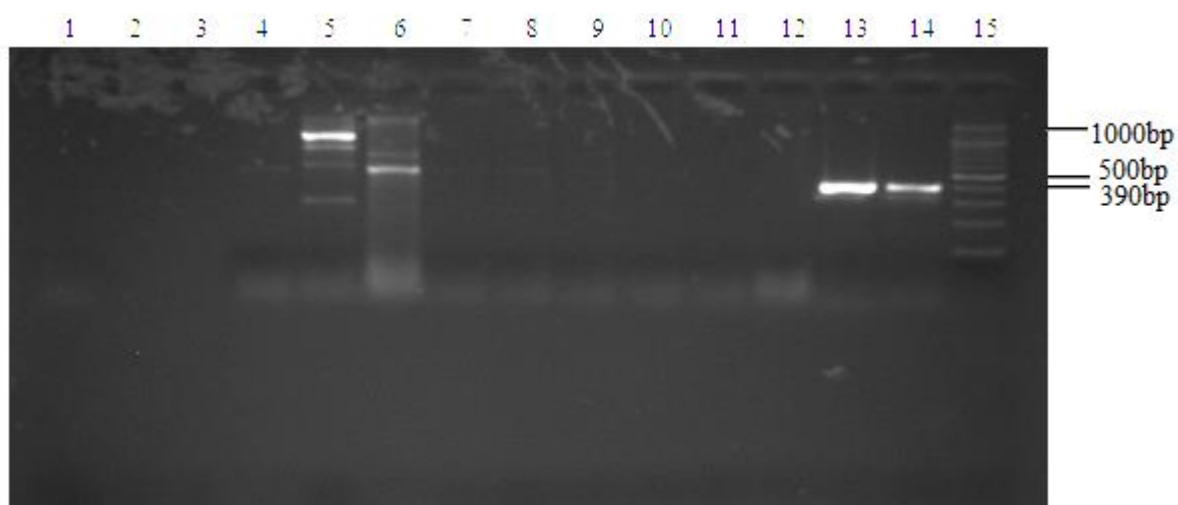
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja bla_{NDM} gena prikazana je na slici 5.8.



Slika 5.8. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja bla_{NDM} gena

16- 100bp ladder- marker molekulske mase je pUC 19 DNA- Sau 3 A (Ambion); 17- *K.pneumoniae* NCTC 13442- pozitivna kontrola za bla_{NDM-1} gen 621bp; 19 i 20- izolati *E.cloacae* kod kojih je dokazano prisustvo bla_{NDM} gena

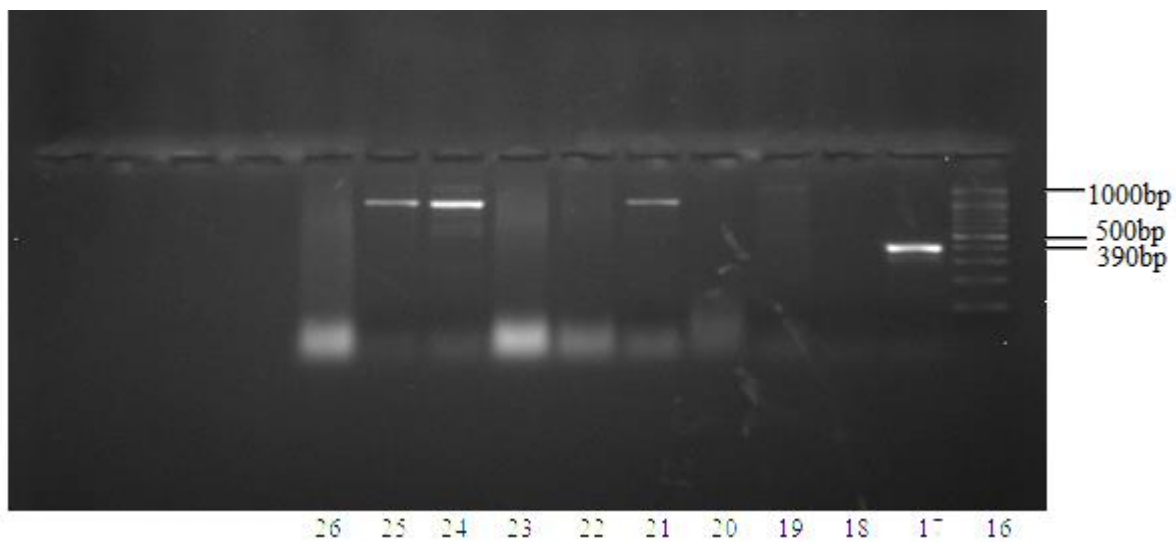
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena prikazana je na slici 5.9



Slika 5.9. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena

1-12- izolati kod kojih je dokazano odsustvo *bla_{VIM}* gena; 13 i 14- *K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla_{VIM}* gen- 390bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena prikazana je na slici 5.10.



Slika 5.10. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena

16- 100bp ladder- marker molekulske mase (O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder); 17- *K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla_{VIM}*-390bp; 18-26- izolati kod kojih je dokazano odsustvo *bla_{VIM}* gena

Kod pedeset dva izolata dokazano je prisustvo gena za produkciju karbapenemaza, i to: 24 bla_{NDM} , 16 $bla_{\text{OXA-48}}$, 10 $bla_{\text{NDM}}/bla_{\text{OXA-48}}$, jedan izolat $bla_{\text{NDM}}/bla_{\text{OXA-48}}/bla_{\text{KPC}}$ i jedan izolat $bla_{\text{KPC}}/bla_{\text{NDM}}$. Kod četiri izolata nisu dokazani $bla_{\text{OXA-48}}$, bla_{NDM} i bla_{KPC} geni. Kod svih 56 ispitanih izolata nije dokazan bla_{VIM} gen. Rezultati detekcije gena prikazani su u tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze kod pojedinih vrsta enterobakterija

Naziv bakterije	Geni za sintezu karbapenemaza				
	bla_{NDM}	$bla_{\text{OXA-48}}$	$bla_{\text{OXA-48}}/bla_{\text{NDM}}$	$bla_{\text{KPC}}/bla_{\text{OXA-48}}/bla_{\text{NDM}}$	$bla_{\text{KPC}}/bla_{\text{NDM}}$
<i>K.pneumoniae</i>	10	16	7	0	1
<i>E. cloacae</i>	8	0	2	1	0
<i>C. freundii</i>	2	0	0	0	0
<i>E.aerogenes</i>	1	0	1	0	0
<i>S. marcescens</i>	1	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	1	0	0	0	0
<i>M. morgani</i>	1	0	0	0	0
Ukupno	24	16	10	1	1

Izolati kod kojih je dokazano prisustvo gena koji kodiraju sintezu karbapenemaza smatraju se karbapenemaza pozitivnim izolatima.

5.1.3.2 Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza pozitivnih izolata enterobakterija

Vitek2 metodom određena je osetljivost na antimikrobne lekove karbapenemaza pozitivnih izolata testiranih enterobakterija. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza pozitivnih izolata, pozitivnih i negativnih kontrola prikazana je u tabeli 5.7. Izolati su grupisani prema bakterijskim vrstama i genima rezistencije.

Tabela 5.7. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza pozitivnih izolata, pozitivnih i negativnih kontrola

Naziv bakterije	Geni rezistencije	Broj izolata	Ertapenem MIK (µg/ml)	Imipenem MIK (µg/ml)	Meropenem MIK (µg/ml)
<i>K.pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM}	10	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	7	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
	<i>bla</i> _{OXA-48}	16	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	1	≥8	≥16	≥16
<i>E.aerogenes</i>	<i>bla</i> _{NDM}	1	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	1	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{NDM}	8	4- ≥8	0,25- ≥16	1- ≥16
	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	2	≥8	≥16	≥16
	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	1	≥8	≥16	≥16
<i>C.freundii</i>	<i>bla</i> _{NDM}	2	≥8	≥16	≥16
<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{NDM}	1	≥8	0,5	1,0
<i>M.morganii</i>	<i>bla</i> _{NDM}	1	1,0	1,0	4,0
<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{NDM}	1	≥8	≥16	≥16
Pozitivne kontrole					
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13440	<i>bla</i> _{VIM}		≥8	≥16	≥16
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13443	<i>bla</i> _{NDM}		≥8	≥16	≥16
<i>K.pneumoniae</i> BAA 1705	<i>bla</i> _{KPC}		≥8	≥16	≥16
<i>K.pneumoniae</i> NCTC 13442	<i>bla</i> _{OXA-48}		≥8	≥16	≥16
Negativne kontrole					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-		≤ 0,125	≤ 0,25	≤ 0,25
<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>bla</i> _{TEM-1}		≤ 0,125	≤ 0,25	≤ 0,25

Kod karbapenemaza pozitivnih izolata, osam (14,28%) je bilo senzitivno na imipenem i 17 (30,35%) intermedijarno osetljivo. Na meropenem je bilo 12 (21,42%) senzitivnih izolata. Na ertapenem su bila dva (0,6%) senzitivna i dva (0,6%) intermedijarno osetljiva izolata. Od ovih

izolata, 25 (44,64%) je imalo imipenem MIK $\leq 4\mu\text{g/ml}$, i to: 18 *K.pneumoniae*, dva izolata *S. marcescens*, dva izolata *E. aerogenes*, dva izolata *E. cloacae* i jedan izolat *P. mirabilis*. Na meropenem je 12 (21,42%) izolata imalo MIK $\leq 4\mu\text{g/ml}$, i to: četiri izolata *K.pneumoniae*, jedan izolat *S. marcescens*, dva izolata *E. aerogenes*, dva izolata *E. cloacae*, jedan izolat *M. morgani* i jedan izolat *P. mirabilis*. Na ertapenem je četiri (7,14%) izolata imalo imipenem MIK $\leq 2\mu\text{g/ml}$, i to po jedan izolat *K.pneumoniae*, *S. marcescens*, *M. morgani* i *P. mirabilis*.

Za sve KPC, OXA-48 i NDM produktore MIK karbapenema bio je $\geq 0.25\ \mu\text{g/ml}$.

Izolati koji su uključeni kao negativna kontrola (MIK $\leq 0.25\ \mu\text{g/ml}$) bili su negativni u svim upotrebljenim testovima.

5.1.3.3. Osetljivost na ostale ispitivane antimikrobne lekove karbapenemaza pozitivnih izolata enterobakterija

Kod izolata produktora karbapenemaza nijedan izolat nije bio osetljiv na ampicilin (MIK $\geq 32\mu\text{g/ml}$), amoksisicilin-klavulansku kiselinu (MIK $\geq 32\mu\text{g/ml}$), cefotaksim (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$), cefepim (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$), ceftazidim (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$) i piperacilin-tazobaktam (MIK $\geq 128\mu\text{g/ml}$). Svi izolati su bili rezistentni na trimetoprim-sulfametoksazol, jedan sa MIK $40\mu\text{g/ml}$ i 51 sa MIK $\geq 320\mu\text{g/ml}$.

Na ciprofloksacin je bilo rezistentno 49 (94,23%) izolata (MIK $\geq 4\mu\text{g/ml}$), jedan izolat bio je intemedijarno osetljiv i jedan izolat senzitivan. Na amikacin je bio rezistentan 21 (37,5%) izolat (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$), intermedijarno osetljivih izolata nije bilo; 44 (84,61%) izolata bilo je rezistentno na gentamicin (MIK $\geq 64\ \mu\text{g/ml}$), a jedan izolat pokazao je intermedijarnu osetljivost.

Od AML testiranih MIK test trakom, svi izolati produktori karbapenemaza bili su osetljivi na tigeciklin (MIC $\leq 2\ \mu\text{g/ml}$), a 18 (32,14%) izolata bilo je rezistentno na kolistin (MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$).

Od ispitanih izolata, 47 izolata bilo je multirezistentno (MDR), a pet izolata je bilo sa proširenom rezistencijom (XDR).

Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza negativnih izolata takođe je određena Vitek 2 AST N204 karticom, definisana kao MIK i izražena u $\mu\text{g/ml}$.

5.1.3.4. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza negativnih izolata enterobakterija

Tabela 5.8. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza negativnih izolata

Naziv bakterije	Enzim (fenotipski)	Broj izolata	Ertapenem MIK ($\mu\text{g/ml}$)	Imipenem MIK ($\mu\text{g/ml}$)	Meropenem MIK ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E.aerogenes</i>	ESBL	1	0,5	2	0,5
<i>S.marcescens</i>	ESBL	1	≥ 8	0,5	1,0
<i>S.marcescens</i>	Amp C	1	0,5	1,0	0,25
<i>P.mirabilis</i>	ESBL	1	0,5	3	0,25

Kod četiri karbapenemaza negativna izolata, dva su bila osetljiva na ertapenem, sva četiri osetljiva na meropenem i jedan osetljiv i tri intermedijarno osetljiva na imipenem. Tri izolata su proizvela ESBL enzime a jedan izolat je proizveo AmpC enzime.

5.1.3.5. Osetljivost na ostale ispitivane antimikrobne lekove karbapenemaza negativnih izolata enterobakterija

Kod izolata kod kojih nije dokazana produkcija karbapenemaza nijedan izolat nije bio osetljiv na ampicilin (MIK $\geq 32\mu\text{g/ml}$), amoksisicilin-klavulansku kiselinu (MIK $\geq 32\mu\text{g/ml}$), cefotaksim (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$) i ceftazidim (MIK $\geq 64\mu\text{g/ml}$). Jedan izolat bio je intermedijarno osetljiv (MIK $8\mu\text{g/ml}$) na cefepim, a na piperacilin- tazobaktam je jedan izolat bio intermedijarno osetljiv (MIK $32\mu\text{g/ml}$) i jedan izolat bio je senzitiv. Svi izolati bili su rezistentni (MIK $\geq 320\mu\text{g/ml}$) na trimetoprim- sulfametoksazol.

Od ispitivanih izolata tri su bila rezistentna na ciprofloksacin (MIK $>2\mu\text{g/ml}$). Dva izolata bila su rezistentna na amikacin (MIK $>64\mu\text{g/ml}$), nije bilo intermedijarno osetljivih izolata, i tri izolata su bila rezistentna na gentamicin (MIK $>64\mu\text{g/ml}$).

Od AML testiranih MIK test trakom, svi izolati kod kojih nije dokazana produkcija karbapenemaza bili su osetljivi na tigeciklin (MIK $<2\mu\text{g/ml}$) i na kolistin (MIK $<2\mu\text{g/ml}$).

Svi izolati bili su multirezistentni (MDR). Nije bilo prošireno rezistentnih (XDR) i panrezistentnih (PDR) izolata.

5.1.4. Rezultati fenotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod enterobakterija

5.1.4.1 Zastupljenost karbapenemaza određena Vitek 2 AES sistemom

Vitek2 Advanced Expert System korišćenjem N204 AST kartice pokazao je različite fenotipove rezistencije. Rezultati Vitek2 AES sistema za fenotipsku detekciju produkcije karbapenemaza u odnosu na rezultate dobijene PCR metodom prema bakterijskoj vrsti prikazani su u tabeli 5.9.

Tabela 5.9. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema bakterijskoj vrsti

Broj izolata	Naziv bakterije	Geni rezistencije (PCR)	Vitek 2AES fenotip
10	<i>K.pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM}	ESBL+CP
2	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM}	ESBL+CP
1	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM}	AmpC+IMPER
6	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM}	CP
2	<i>C. freundii</i>	<i>bla</i> _{NDM}	CP
1	<i>S.marcescens</i>	<i>bla</i> _{NDM}	CP
1	<i>E.coli</i>	<i>bla</i> _{NDM}	ESBL+CP
16	<i>K.pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{OXA-48}	ESBL+CP
7	<i>K.pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	ESBL+CP
1	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	ESBL+CP
1	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	HL CASE+IMP
1	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	AmpC+IMPER
1	<i>M. morgani</i>	<i>bla</i> _{NDM}	ESBL
1	<i>K.pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	ESBL+CP
1	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{OXA-48}	ESBL+CP
Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim (fenotipski)	Vitek 2AES fenotip
1	<i>K.pneumoniae</i>	ESBL	ESBL
1	<i>P. mirabilis</i>	ESBL	ESBL
1	<i>S. marcescens</i>	ESBL	ESBL
1	<i>S. marcescens</i>	Amp C	ESBL+ACQ

Stečene cefalosporinaze (engl.-*acquired cephalosporinase*-ACQ), nepropustljivost- (engl.-*impermeability*-IMPER), karbapenemaze (engl.- *carbapenemase*-CP, ESBL, AmpC, visok nivo produkcije cefalosporinaza- (engl.- *high-level cephalosporinase*-HL CASE); CP je definisan kao „*carbapenemase -metallo- or OXA*”, u tabeli podrazumevano kao „karbapenemaza”

Rezultati Vitek2 AES sistema za fenotipsku detekciju produkcije karbapenemaza u odnosu na rezultate dobijene PCR metodom prema vrsti enzima prikazani su u tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema vrsti enzima

PCR	VITEK 2 AES	
Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati (broj)
NDM (16)	16 CP	1 AmpC+IMPER
NDM/ESBL (8)	6 ESBL+CP	1 ESBL
OXA-48(3)	16 ESBL+CP	/
OXA-48/ESBL (13)		
NDM/OXA-48 (9)	8 ESBL+CP	1 HL CASE+IMP
NDM/OXA-48/ESBL (1)		1 AmpC+IMPER
NDM/KPC (1)	1 ESBL+CP	/
NDM/KPC/OXA-48 (1)	1 ESBL+CP	/
Karbapenemaza negativni izolati(broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati(broj)
ESBL (3)	/	3 ESBL
AmpC (1)	/	1/ESBL+ ACQ

Stečene cefalosporinaze (engl.-*acquired cephalosporinase*-ACQ), nepropustljivost- (engl.-*impermeability*-IMPER), karbapenemaze (engl.-*carbapenemase*-CP, ESBL, AmpC, visok nivo produkcije cefalosporinaza- (engl.- *high-level cephalosporinase*-HL CASE); CP je definisan kao „*carbapenemase -metallo- or OXA*”, u tabeli podrazumevano kao „karbapenemaza”

Fenotip rezistencije utvrđen Vitek 2 AES sistemom u odnosu na rezultate dobijene PCR metodom prema broju pozitivnih/negativnih i lažno pozitivnih/lažno negativnih izolata prikazani su u tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema broju pozitivnih/negativnih i lažno pozitivnih/lažno negativnih izolata

PCR	VITEK 2 AES	
Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati (broj)
NDM (24)	22	2
OXA-48 (16)	16	/
NDM/OXA-48 (10)	8	2
NDM/KPC (1)	1	/
NDM/KPC/OXA-48 (1)	1	/
Karbapenemaza negativni izolati (broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati (broj)
ESBL (3)	/	3
AmpC (1)	/	1

Produkcija karbapenemaza Vitek2 AES sistemom definisana je u 48 od 56 (85,71%) izolata. Najveći broj izolata bio je definisan kao ESBL+CP - β laktamaze proširenog spektra i karbapenemaze- metalo- ili oksacilinaze (engl.-*extended spectrum beta lactamase + carbapenemase-metallo- or OXA*). Drugi detektovani fenotip bile su karbapenemaze- CP (engl.-*carbapenemase -metallo- or OXA*), 9 od 56 (16,07%).

Kod NDM pozitivnih izolata 22 od 24 izolata korektno su definisana kao potencijalni produktori karbapenemaza. Dva izolata su bila lažno negativna- jedan izolat *M. morganii* bio je definisan kao produktor ESBL enzima, i jedan izolat *E. aerogenes*- kao produktor AmpC enzima u kombinaciji sa izmenom porina. Svi izolati koji su produkovali samo OXA-48 enzime (16) su korektno određeni. Produkcija karbapenemaza određena je korektno i kod 10 od 12 izolata koji su produkovali više od jednog enzima. Dva izolata su bila lažno negativna- jedan izolat *E. aerogenes* koji je produkovao NDM/OXA-48 enzime definisan je kao hiperproduktor cefalosporinaza sa smanjenom propustljivosti spoljašnje membrane i jedan izolat *E.cloacae* koji je produkovao NDM/OXA-48 enzime definisan je kao produktor AmpC enzima sa smanjenom propustljivosti spoljašnje membrane. Nije bilo lažno pozitivnih rezultata.

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti Vitek2 AES sistema

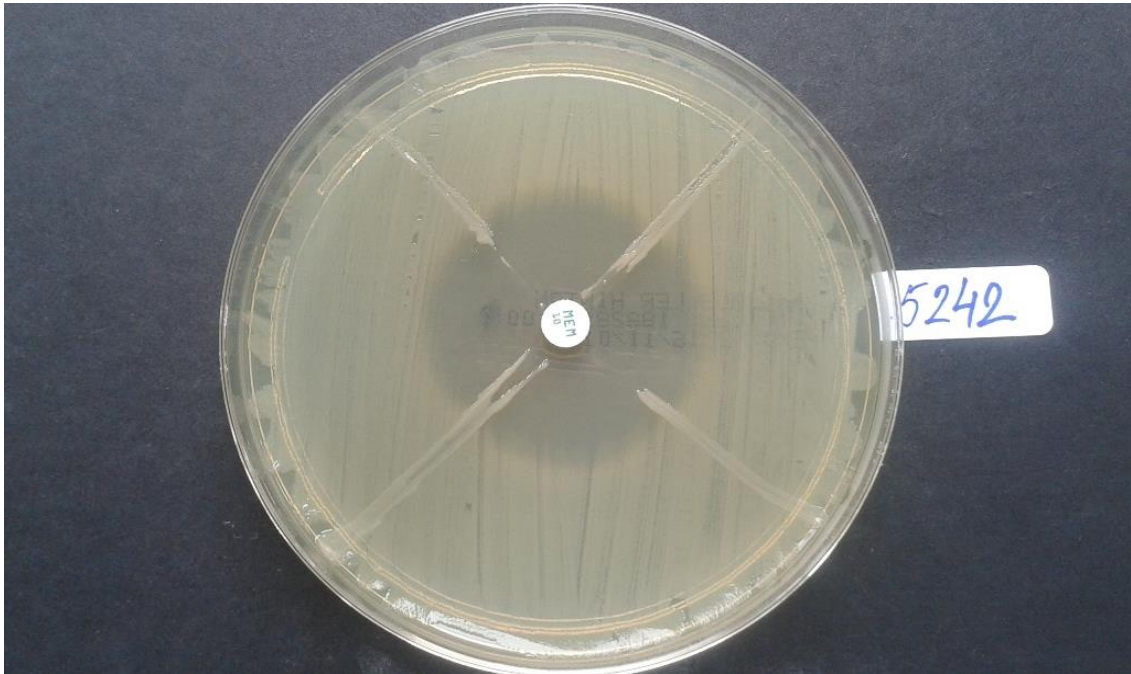
Vitek2 AES sistem je pokazao senzitivnost 98,08% i specifičnost 100,00%. Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) prikazani su u tabeli 5.12.

Tabela 5.12. Senzitivnost i specifičnost Vitek2 AES sistema

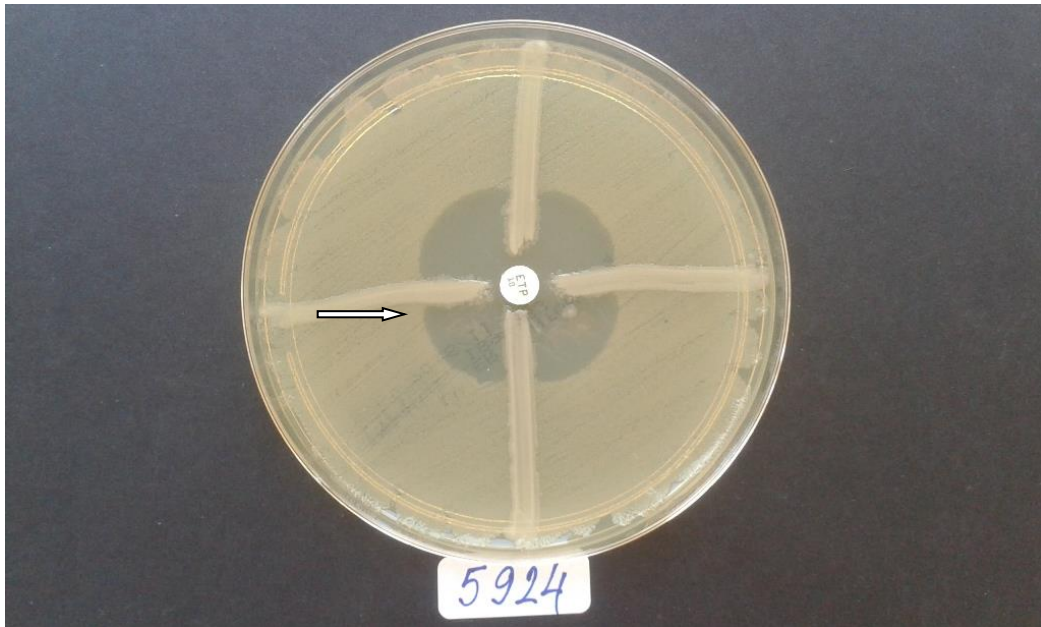
Vitek2 AES	PCR KPC		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	51	0	100.00 %	
Negativan	1	4		80.00 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	98.08%	100.00 %		

5.1.4.2 Rezultati modifikovanog Hodge-testa za detekciju produkcije karbapenemaza

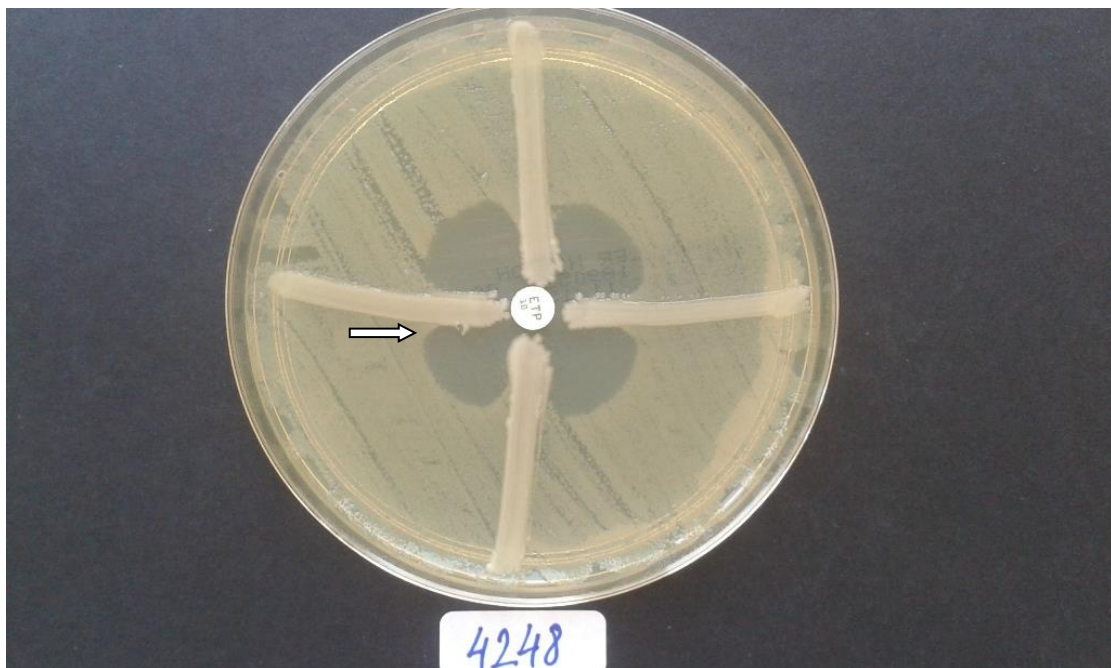
Modifikovani Hodge-test bio je pozitivan kod 45 izolata kod kojih je PCR metodom dokazano prisustvo gena koji kodiraju karbapenemaze. Lažno pozitivnih izolata nije bilo, a test je pokazao sedam lažno negativnih izolata- slike 5.11-5.14.



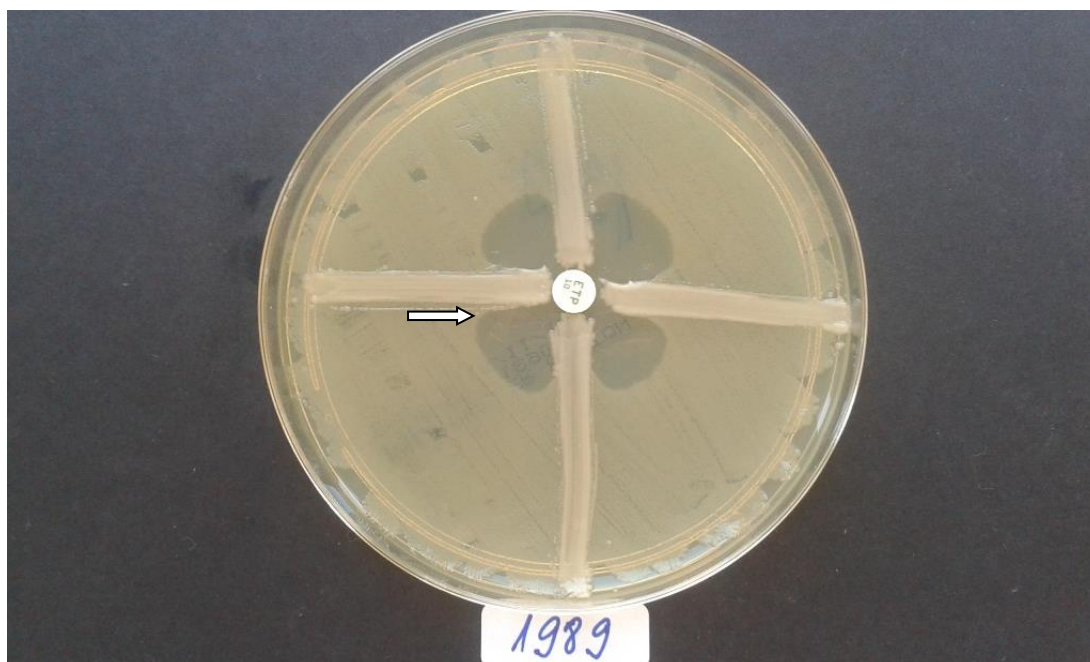
Slika 5.11. Negativan modifikovani Hodge test (MHT)-nema deformacije zone inhibicije



Slika 5.12. Slabo pozitivan (+/-) modifikovani Hodge test (MHT)-diskretno vidljiva deformacija zone inhibicije



Slika 5.13. Pozitivan (+) modifikovani Hodge test (MHT)-jasno vidljiva deformacija zone inhibicije



Slika 5.14. Jako pozitivan (++) modifikovani Hodge test (MHT)-jako izražena deformacija zone inhibicije

Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koji proizvode samo jedan tip enzima

Analizom modifikovanog Hodge-testa kod karbapenemaza pozitivnih izolata koji proizvode samo jedan tip enzima uočeno je da je kod NDM pozitivnih izolata 14 od 19 izolata bilo slabo pozitivno (+/-), a samo tri izolata pozitivno (+) dok je sedam izolata bilo negativno. Kod OXA-48 pozitivnih izolata MHT test je kod 11 od 16 izolata bio pozitivan (+), a kod četiri od 15 izolata jako pozitivan (++) . Rezultati su prikazani u tabeli 5.13.

Tabela 5.13. Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koji produkuju samo jedan tip enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	Rezultat
7	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-
8	<i>E. aerogenes</i>	NDM	+/-
2	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+/-
1	<i>S. marcescens</i>	NDM	+/-
1	<i>C. freundii</i>	NDM	+/-
1	<i>E.coli</i>	NDM	+/-
1	<i>M.morganii</i>	NDM	+/-
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+
1	<i>E. cloacae</i>	NDM	+
1	<i>C. freundii</i>	NDM	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	+
4	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	++
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-

Jako pozitivan (++) , pozitivan (+), slabo pozitivan (+/-), negativan (-)

Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koji produkuju više različitih tipova enzima

Modifikovani Hodge test kod ovih izolata pokazao je slabu pozitivnost kod osam od 12 izolata, dok je jedan od 12 izolata bio pozitivan a tri od 12 izolata bilo je jako pozitivno (tabela 5.14.).

Tabela 5.14. Modifikovani Hodge-test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koje produkuju više različitih tipova enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	Rezultat
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+/-
2	<i>E. cloacae</i>	OXA 48/NDM	+/-
1	<i>E. aerogenes</i>	OXA 48/NDM	+/-
1	<i>E. cloacae</i>	KPC/OXA 48/NDM	+/-
1	<i>K.pneumoniae</i>	KPC/NDM	+/-
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	++

Jako pozitivan (++) , pozitivan (+), slabo pozitivan (+/-), negativan (-)

Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza negativnih izolata

Sojevi AmpC i ESBL pozitivni nisu pokazali zonu inhibicije koja bi mogla biti pogrešno protumačena kao pozitivan MHT test -nije bilo lažno pozitivnih testova (tabela 5.15.).

Tabela 5.15. Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza negativnih izolata

Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim (fenotipski)	Rezultat
1	<i>P.mirabilis</i>	ESBL	-
1	<i>S.marcescens</i>	Amp C	-
1	<i>S. marcescens</i>	ESBL	-
1	<i>P. mirabilis</i>	ESBL	-

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti MHT testa

Modifikovani Hodge test tačno je identifikovao 45 od 52 produkatora karbapenemaza (86,54% senzitivnost, 100,00% specifičnost). Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) prikazani su u tabeli 5.16.

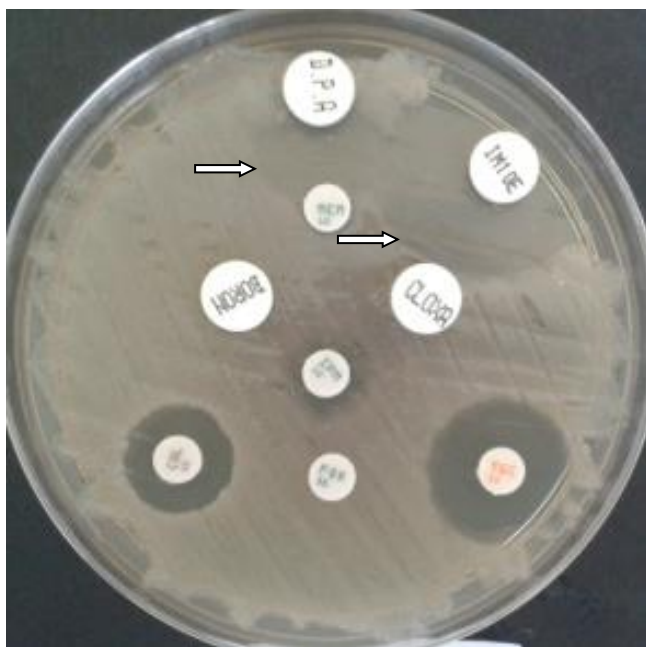
Tabela 5.16. Senzitivnost i specifičnost MHT testa

MHT	PCR		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	45	0	100.00 %	
Negativan	7	4		36,36 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	86,54%	100,00 %		

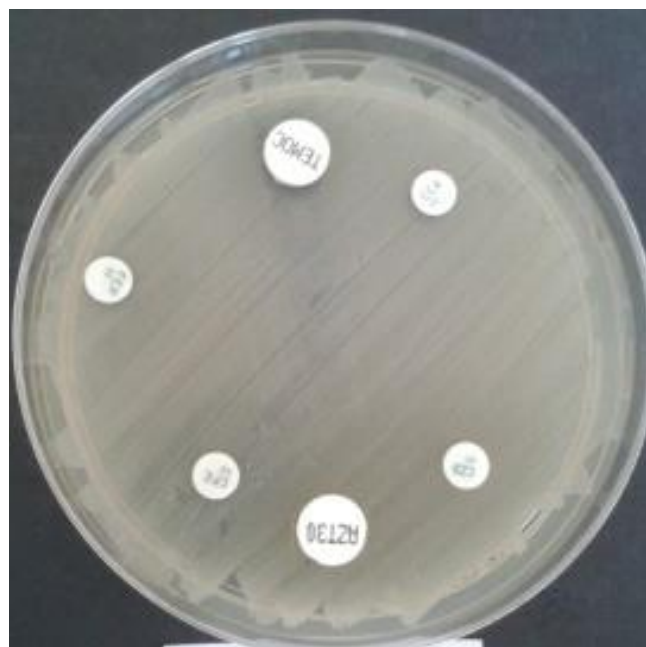
5.1.4.3. Rezultati fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza

Za dokazivanje karbapenemaza ovim testom korišćeno je istovremeno testiranje diska imipenema sa diskovima EDTA, dipikolonične kiseline, boronične kiseline i kloksacilina (slike 5.15.-5.17).

Detekcija metalo- β -laktamaza vršena je diskovima DPA i EDTA. Pozitivan test kod izolata kod kojih je PCR metodom dokazan *bla_{NDM}* gen prikazan je na slici 5.15.- deformacija zone inhibicije ili pojava „fantom zone“ između diska meropenema i diska DPA ili EDTA.



Detekcija metalo- β -laktamaza- NDM pozitivan izolat: deformacija zone između diska meropenema i diska DPA; razlika u zoni IPM/IMI OE>7mm

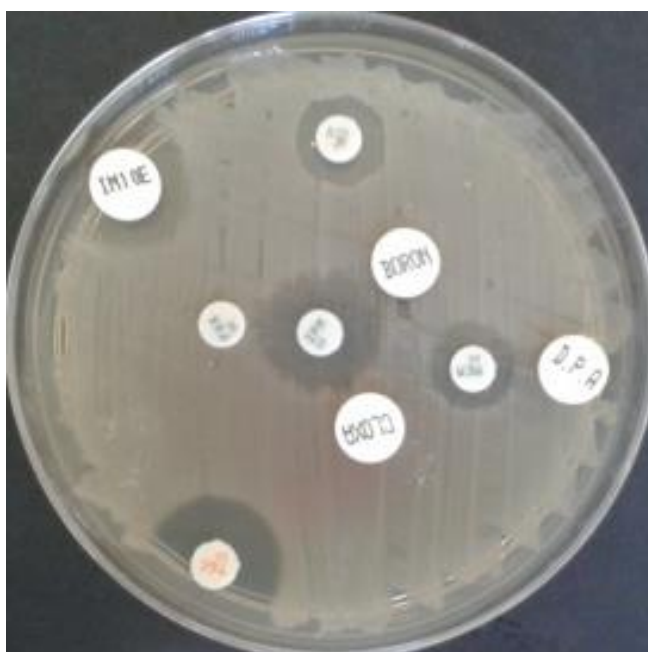


Detekcija metalo- β -laktamaza - NDM pozitivan izolat- negativan DDT test (nema razlike u zoni inhibicije CZD/CCA i FEP/CPE)

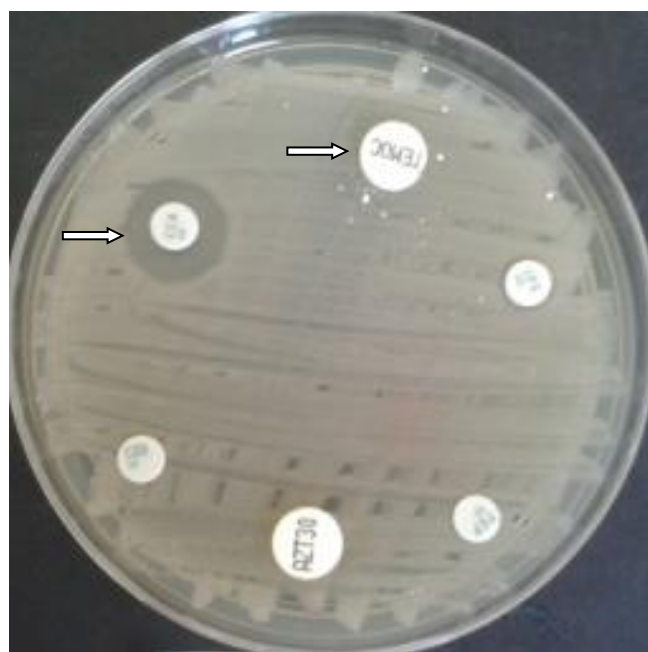
Slika 5.15. Prikaz pozitivnog fenotipskog testa sinergizma za detekciju produkcije metalo- β -laktamaza- NDM pozitivan soj

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA-kloksacilin; BORON-boronična kiselina; TEMOC-temocilin; IMI-OE-imipenem-EDTA; MEM-meropenem; IPM- imipenem; FOX-cefoksitin; AZT30- aztreonam; CZD- ceftazidim; CCA- ceftazidim-klavulanska kiselina; FEP- cefepim; CPE- cefepim-klavulanska kiselina

Detekcija oksacilinaza vršena je diskom temocilina. Pozitivan test kod izolata kod kojih je PCR metodom dokazan *bla*_{OXA-48} gen prikazan je na slici 5.16.- rezistencija na temocilin, bez pojave deformacije zone na ostale inhibitore.



Detekcija OXA-48 enzima: OXA-48 pozitivan izolat-nema sinergizma sa indikatorima AmpC enzima, metalo- β -laktamaza i karbapenemaza A klase

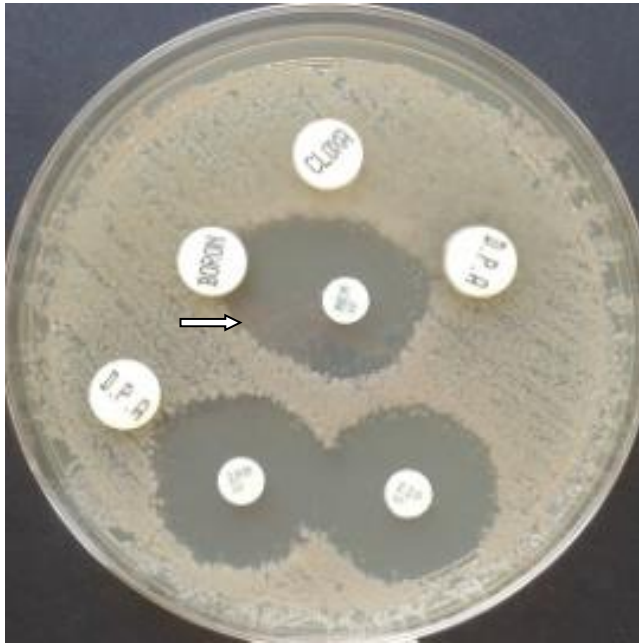


Detekcija OXA-48 enzima: OXA-48/ESBL pozitivan izolat-rezistencija na temocilin (TEMOC); pozitivan DDT test (razlika u zoni inhibicije CZD/CCA >5mm; nema razlike u zoni inhibicije FEP/CPE.

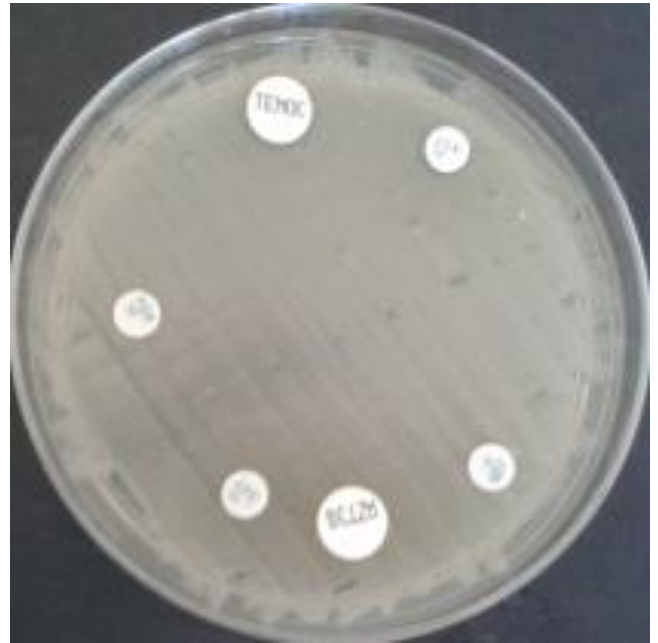
Slika 5.16. Prikaz fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza – OXA-48

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA-kloksacilin; BORON-boronična kiselina; TEMOC-temocilin; IMI-OE-imipenem-EDTA; MEM-meropenem; IPM- imipenem; FOX-cefoksitin; AZT30- aztreonam; CZD- ceftazidim; CCA- ceftazidim-klavulanska kiselina; FEP- cefepim; CPE- cefepim-klavulanska kiselina

Detekcija karbapenemaza A klase vršena je diskom boronične kiseline. Pozitivan test kod izolata kod kojih je PCR metodom dokazan *bla_{KPC}* gen prikazan je na slici 5.17.- deformacija zone inhibicije između diska meropenema i diska boronične kiseline.



Detekcija karbapenemaza A klase:
- KPC pozitivan izolat- synergizam između meropenema i boronične kiseline

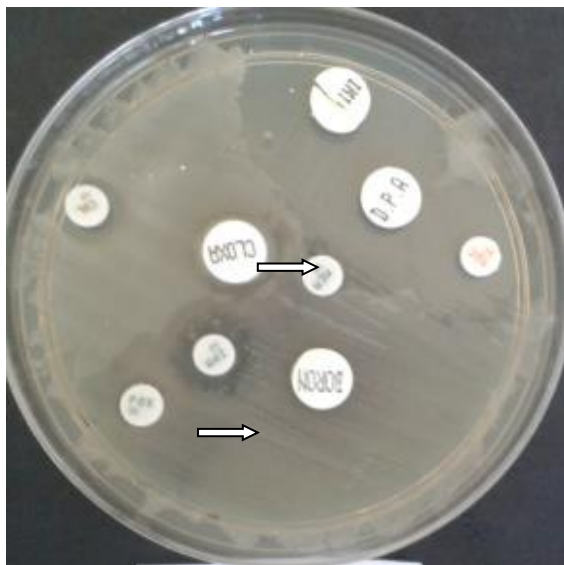


Detekcija karbapenemaza A klase
- DDT test negativan

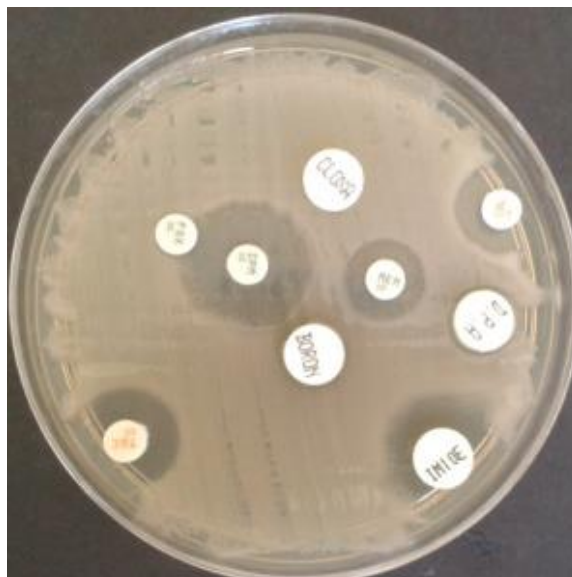
Slika 5.17. Prikaz fenotipskih testova synergizma za detekciju produkcije karbapenemaza A klase

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA-kloksacilin; BORON-boronična kiselina; TEMOC-temocilin; IMI-OE-imipenem-EDTA; MEM-meropenem; IPM- imipenem; FOX-cefoksitin; AZT30- aztreonam; CZD- ceftazidim; CCA- ceftazidim-klavulanska kiselina; FEP- cefepim; CPE- cefepim-klavulanska kiselina

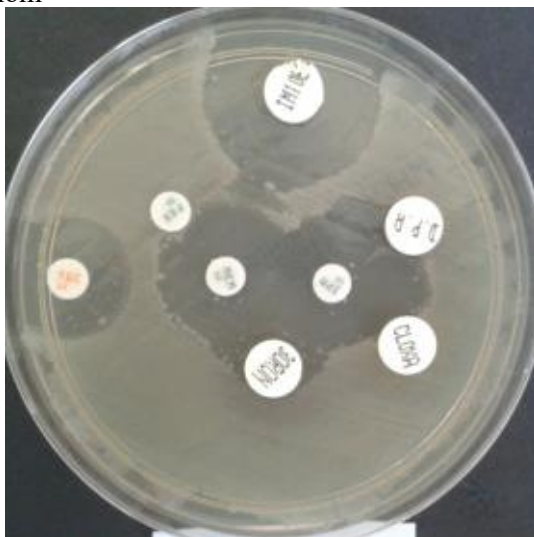
Fenotipska detekcija karbapenemaza kod izolata kod kojih je dokazano prisustvo gena za dve različite klase karbapenemaza prikazana je na slici 5.18.



Detekcija enzima klase A i metalo- β -laktamaza kod izolata koji produkuju KPC i NDM enzime-
sinergizam meropenema sa dipikoloničnom kiselinom i
imipenema sa boroničnom kiselinom



Detekcija enzima klase A i metalo- β -laktamaza kod izolata koji produkuju OXA-48/NDM enzime-
negativan test sinergizma



Detekcija enzima klase A i D i metalo- β -laktamaza kod izolata koji produkuje KPC/OXA/48/NDM enzime-
sinergizam meropenema i imipenema sa boroničnom i imipenema sa dipikoloničnom kiselinom; razlika u zoni
IPM/IMI OE>7mm

Slika 5.18. Prikaz fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza kod izolata sa više enzima

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA-kloksacilin; BORON-boronična kiselina; TEMOC-temocilin; IMI-OE-imipenem-EDTA; MEM-meropenem; IPM- imipenem; FOX-cefoksitin; AZT30- aztreonam; CZD-ceftazidim; CCA- ceftazidim-klavulanska kiselina; FEP- cefepim; CPE- cefepim-klavulanska kiselina

Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji proizvode samo NDM enzim je u 21 od 24 slučaja pokazao pozitivnost testiranjem sa DPA i 22 od 24 slučaja pozitivnost testom inhibicije diskom imipenem+EDTA. Samo jedan NDM pozitivan izolat bio je negativan kod svih upotrebljenih testova. Od 16 OXA-48 pozitivnih izolata, kod 13 je detektovan slabo izražen fenomen sinergizma sa boroničnom kiselinom i kod jednog sa DPA. Svih 16 izolata bilo je rezistentno na temocilin. Jedan izolat *E.cloacae* bio je slabo pozitivan na boroničnu kiselinu i kloksacilin, što ukazuje na potencijalnu produkciju AmpC enzima. Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji proizvode samo jedan tip enzima prikazani su u tabeli 5.17.

Tabela 5.17. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	BOR	CLOXA	DPA	EDTA	Temocilin
2	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	+(FZ)	+	R
1	<i>E. aerogenes</i>	NDM	-	-	+(FZ)	+	S
1	<i>S. marcescens</i>	NDM	-	-	+(FZ)	+	R
2	<i>E. cloacae</i>	NDM	+/-	-	+(FZ)	+	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+/-	-	+(FZ)	+	R
2	<i>E. cloacae</i>	NDM	+/-	+/-	+(FZ)	+	S
5	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	+	+	R
2	<i>E. cloacae</i>	NDM	-	-	+	+	S
1	<i>C. freundii</i>	NDM	-	-	+	+	R
1	<i>M. morgani</i>	NDM	-	-	+	+	R
1	<i>E. cloacae</i>	NDM	+	-	+	+	S
1	<i>E.coli</i>	NDM	-	-	+	+	S
1	<i>C. freundii</i>	NDM	+/-	-	+	+	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	+	+	+	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	-	-	S
1	<i>E. cloacae</i>	NDM	-	-	-	+	R
12	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	+/-	-	-	-	R
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-	-	-	-	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	+/-	-	+/-	-	R

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA- kloksacilin; BOR-boronična kiselina; IMI/EDTA-imipenem/EDTA; FZ- „fantom“ zona

Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Svi izolati koji su proizveli više od jednog enzima bili su NDM pozitivni. Kod svih 12 izolata EDTA test bio je pozitivan, dok je DPA bio pozitivan u 5 od 12 slučajeva. S obzirom na postojanje sinergizma kod DPA i EDTA, nije moguće tumačiti rezistenciju na temocilin, koja je registrirana u 9 od 11 OXA 48/NDM izolata.

Od 12 izolata koji su proizveli više od jednog enzima dva izolata pokazala su prisustvo KPC enzima- *Enterobacter cloacae*, kod kojih su PCR metodom osim gena koji kodiraju KPC enzim detektovani i geni koji kodiraju produkciju OXA-48 i NDM enzima i *Klebsiella pneumoniae* kod kojih su detektovani geni za produkciju KPC i NDM enzima. Testom sinergizma zabeležen je slab pozitivan rezultat kod oba ispitana KPC pozitivna izolata (fenomen sinergizma karbapenema sa boroničnom kiselinom nije bio jasno izražen). Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima prikazan je u tabeli 5.18.

Tabela 5.18. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	BOR	CLOXA	DPA	EDTA	Temocilin
1	<i>E.cloacae</i>	KPC/OXA 48/NDM	+/-	-	+(FZ)	+	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	KPC/NDM	+/-	-	+	+	R
1	<i>E.cloacae</i>	OXA 48/NDM	+/-	-	+	+	R
1	<i>E.cloacae</i>	OXA 48/NDM	+/-	+/-	+(FZ)	+	S
1	<i>E. aerogenes</i>	OXA 48/NDM	-	-	-	+	R
4	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-	-	-	+	R
2	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+	-	-	+	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+/-	-	+/-	+	R

DPA-dipikolonična kiselina; CLOXA- kloksacilin; BOR-boronična kiselina; IMI/EDTA-imipenem/EDTA; FZ- „fantom“ zona

Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata nije dao lažno pozitivne rezultate (tabela 5.19.)

Tabela 5.19. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata

Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim (fenotipski)	BOR	CLOXA	DPA	EDTA	Temocilin
1	<i>S.marcescens</i>	ESBL	-	-	-	-	S
1	<i>P.mirabilis</i>	ESBL	-	-	-	-	S
1	<i>S.marcescens</i>	Amp C	-	-	-	-	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	-	S

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti DPA testa

Test sinergizma pokazao je za DPA visoke vrednosti specifičnosti 95% i PPV 96,43%.

Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za DPA prikazani su u tabeli 5.20.

Tabela 5.20. Senzitivnost i specifičnost DPA testa

DPA	PCR NDM		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	27	1	96.43 %	
Negativan	9	19		67.86 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	75.00%	95.00 %		

DPA-dipikolonična kiselina; PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti EDTA testa

Test sinergizma pokazao je za EDTA visoke vrednosti specifičnosti- 100% i PPV- 100%.

Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za EDTA prikazani su u tabeli 5.21.

Tabela 5.21. Senzitivnost i specifičnost EDTA testa

EDTA	PCR NDM		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	30		100.00 %	
Negativan	6	20		76.92 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	83.33%	100.00 %		

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti testa sinergizma boronične kiseline

Veliki broj lažno pozitivnih izolata, posebno kod OXA-48 pozitivnih, 15 od 16, uslovljava nisku specifičnost (51,58%) i nisku PPV (7,14%).

Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za boroničnu kiselinu prikazani su u tabeli 5.22.

Tabela 5.22. Senzitivnost i specifičnost testa sinergizma boronične kiseline

BORONIČNA KISELINA	PCR KPC		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	2	26	7.14 %	
Negativan	0	28		100.00 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	100.00%	51.85 %		

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

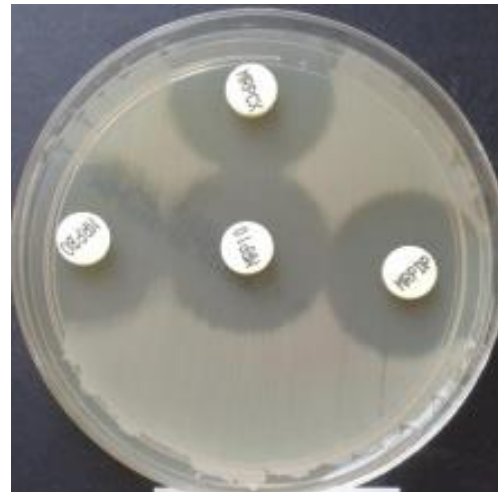
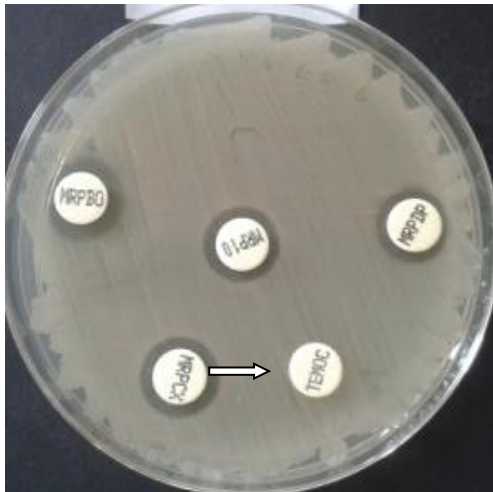
Rezultati testiranja osetljivosti diskom aztreonama

Osetljivost na disk aztreonama uz pozitivne testove na DPA i EDTA ukazuje na prisustvo metalo- β -laktamaza. Testiranje diskom aztreonama dalo je pozitivne rezultate kod pet NDM pozitivnih izolata. Kod osam NDM pozitivnih izolata prisustvo ESBL enzima dalo je rezistenciju na aztreonam, pa uprkos pozitivnim testovima na MBL test sa diskom aztreonama nije mogao biti tumačen.

5.1.4.4. Rezultati kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza

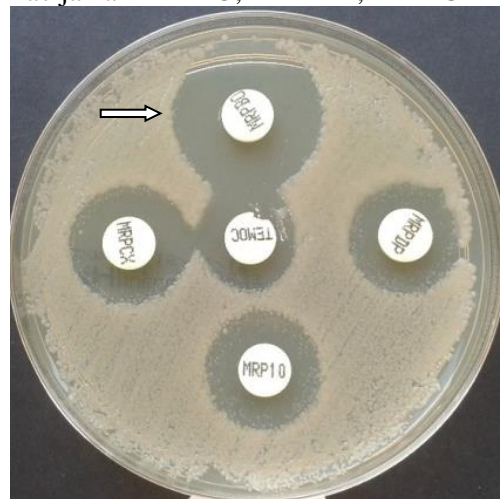
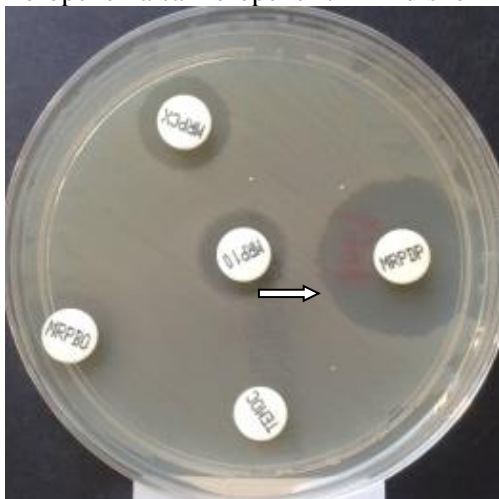
Ispitivanje produkcije karbapenemaza CDT metodom vršeno je komercijalnim testom- KPC/Metallo-beta-lactamase and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica).

Za dokazivanje karbapenemaza ovim testom korišćeno je istovremeno testiranje diska meropenema sa diskovima meropenem/dipikolonične kiseline, meropenem/boronične kiseline, meropenem/kloksacilina i temocilina (slika 5.19.)



OXA-48 pozitivan izolat- nema zone inhibicije oko diska temocilina, nema razlike u zoni inhibicije oko diska meropenema sa meropenem/DPA diskom

Izolat negativan na produkciju karbapenemaza- nema razlike u zoni inhibicije MRP 10 sa kombinacijama MRP BO, MRP DP, MRP CX

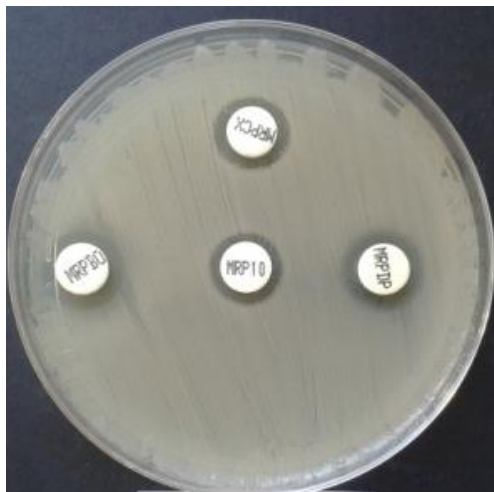


NDM pozitivan izolat-razlika u zoni inhibicije MRP/MRP DP >5mm

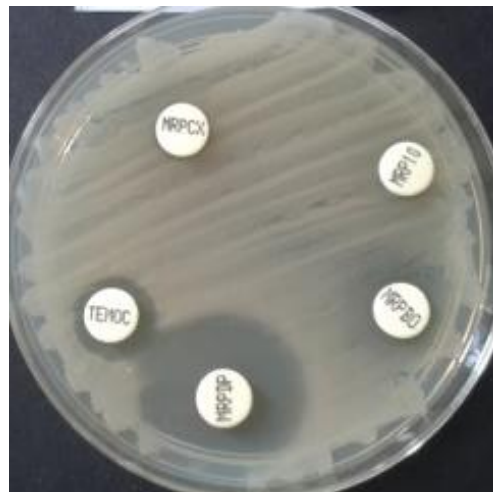
KPC pozitivan izolat-razlika u zoni inhibicije MRP/MRP BO >5mm

Slika 5.19. Prikaz kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza

MRP 10-meropenem, MRP BO- meropenem-boronična kiselina, MRP-DP- meropenem dipikolonična kiselina, MRP CX-meropenem kloksacilin



OXA-48/NDM pozitivan izolat- nema razlike u zoni inhibicije MRP 10 sa kombinacijama MRP BO, MRP DP, MRP CX



KPC/NDM razlika u zoni inhibicije MRP/MRP DP >5mm, nema razlike u zoni inhibicije MRP/MRP BO



NDM pozitivan izolat- razlika u zoni inhibicije MRP 10/MRP DP >5mm, i IPM/ IMI OE >7mm

Slika 5.19. Prikaz kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza

MRP 10-meropenem, MRP BO- meropenem-boronična kiselina, MRP DP- meropenem dipikolinična kiselina, MRP CX-meropenem kloksacilin, IPM- imipenem, IMI OE- imipenem+ EDTA

Rezultati kombinovanog disk testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Kombinovani disk test sa EDTA kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo NDM enzime je kod samo dva od 24 izolata (jedan izolat *M. morganii* i jedan izolat *K.pneumoniae*) bio negativan, a u 22 od 24 izolata pozitivan. Kombinovani disk test DPA dao je iste rezultate, dva negativna od 24 (jedan izolat *E. cloacae* i jedan izolat *K.pneumoniae*) i u 22 od 24 izolata test je bio pozitivan. Kombinovani disk test boronične kiseline bio je pozitivan kod osam OXA-48 pozitivnih izolata i dva NDM pozitivna izolata. Kod OXA-48 pozitivnih izolata, nijedan nije dao pozitivan CDT DPA ni MIC EDTA, i svi su bili rezistentni na temocilin. CDT kloksacilina bio je pozitivan zajedno sa testom boronične kiseline samo kod jednog NDM izolata, što ukazuje na udruženu AmpC produkciju.

Rezultati kombinovanog disk testa (CDT) testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima prikazani su u tabeli 5.23.

Tabela 5.23. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	CDT BOR	CDT CLOXA	CDT DPA	MIC EDTA	Temocilin
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+	+	+	+	R
7	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	+	+	R
1	<i>E. cloacae</i>	NDM	-	-	-	+	R
1	<i>S.marcescens</i>	NDM	-	-	+	+	R
2	<i>C. freundii</i>	NDM	-	-	+	+	R
8	<i>E. cloacae</i>	NDM	-	-	+	+	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	+	+	S
1	<i>M. morganii</i>	NDM	-	-	+	-	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-	-	-	-	S
1	<i>E.coli</i>	NDM	+	-	+	+	S
8	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	+	-	-	-	R
8	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-	-	-	-	R

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina; EDTA-etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina

Rezultati kombinovanog disk testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Kombinovani disk test sa DPA bio je pozitivan kod sedam od 12 izolata, a sa EDTA je bio pozitivan u šest od 12 izolata. Kombinovani disk test boronične kiseline bio je negativan kod oba KPC pozitivna izolata. Test temocilina, po uputstvu proizvođača, mogao je da bude protumačen kao pozitivan kod samo tri OXA-48/NDM pozitivna izolata *K.pneumoniae*. Kod ostalih izolata nije mogao da bude protumačen zbog pozitivnosti u testu sa DPA i boroničnom kiselinom. Kombinovani disk test sa kloksacilinom bio je negativan kod svih testiranih izolata.

Rezultati kombinovanog disk testa (CDT) testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji proizvode više različitih tipova enzima prikazani su u tabeli 5.24.

Tabela 5.24. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	CDT BOR	CDT CLOXA	CDT DPA	CDT EDTA	Temocilin
1	<i>E.cloacae</i>	KPC/OXA 48/NDM	-	-	+	+	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	KPC/NDM	-	-	+	+	R
1	<i>E. cloacae</i>	OXA 48/NDM	-	-	+	+	S
2	<i>E. cloacae</i>	OXA 48/NDM	-	-	+	+	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-	-	+	+	R
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-	-	+	-	S
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-	-	-	-	R
2	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+	-	-	-	R

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina; EDTA-etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina

Rezultati kombinovanog disk testa kod karbapenemaza negativnih bakterija

Kombinovani disk test DPA/EDTA i test temocilina kod karbapenemaza negativnih bakterija bili su negativni kod svih izolata. Test CDT boronične kiseline i kloksacilina koji su indikator produkcije AmpC enzima bili su pozitivni kod jednog izolata *S. marcescens* koji je i Vitek 2 AES definisao kao izolat koji je potencijalni produktor AmpC (Tabela 5.25.).

Tabela 5.25. Kombinovani disk test kod karbapenemaza negativnih bakterija

Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim	CDT BOR	CDT CLOXA	CDT DPA	CDT EDTA	Temocilin
1	<i>P.mirabilis</i>	ESBL	-	-	-	-	S
1	<i>S. marcescens</i>	Amp C	+	+	-	-	S
1	<i>K.pneumoniae</i>	ESBL	-	-	-	-	S
1	<i>S. marcescens</i>	ESBL	-	-	-	-	S

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti kombinovanog disk testa sa dipikoliničnom

kiselinom

Najbolje rezultate CDT testa sa DPA pokazali su specifičnost i PPV-100%. Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za CDT DPA prikazani su u tabeli 5.26.

Tabela 5.26. Senzitivnost i specifičnost kombinovanog disk testa sa dipikoliničnom

kiselinom

CDT DPA	PCR NDM		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	29	0	100,00 %	
Negativan	7	20		74,07 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	80,56%	100,00 %		

DPA- dipikolinična kiselina; PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti kombinovanog disk testa sa boroničnom

kiselinom

Kombinovani disk test (CDT) sa boroničnom kiselinom nije dao zadovoljavajuće rezultate senzitivnosti i specifičnosti. Od ispitanih 56 izolata kod samo dva izolata PCR metodom dokazani su geni za produkciju KPC enzima -*E. cloacae* KPC/OXA 48/NDM i *K.pneumoniae* KPC/NDM. Kombinovani disk test sa boroničnom kiselinom zabeležio je negativan rezultat kod oba ispitana izolata. Veliki broj lažno pozitivnih izolata, posebno kod OXA-48 pozitivnih, 10 od 16, i nemogućnost detekcije stvarno pozitivnih KPC izolata uslovio je nisku specifičnost (77,78%) i nisku PPV i senzitivnost (0%).

Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za CDT boronične kiseline prikazani su u tabeli 5.27.

Tabela 5.27. Senzitivnost i specifičnost CDT sa boroničnom kiselinom

CDT BOR	PCR KPC		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	0	12	0,00 %	
Negativan	2	42		95,45 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	0,00%	77,78 %		

BOR-boronična kiselina; PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

Rezultati kombinovanog disk testa sa kloksacilinom

Od ispitanih 56 izolata, dva su pokazala pozitivan rezultat na prisustvo AmpC enzima-*Serratia marcescens* karbapenemaza negativan i *K.pneumoniae* NDM pozitivna. Senzitivnost i specifičnost nije mogla biti određena jer AmpC enzimi nisu potvrđeni genotipskim metodama.

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti kombinovanog disk testa sa temocilinom

Analiza rezultata CDT temocilina izvršena je kod izolata koji su ispunjavali kriterijume za analizu testa diskom temocilina.

Senzitivnost i specifičnost CDT sa temocilinom određivana je u odnosu na broj testiranih izolata koji su mogli da budu protumačeni prema uputstvu proizvođača. Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za CDT sa temocilinom prikazani su u tabeli 5.28.

Tabela 5.28. Senzitivnost i specifičnost CDT sa temocilinom

Temocilin	PCR OXA		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	21	0	100,0 %	
Negativan	1	5		83,33 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	95,65%	100,00 %		

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

5.1.4.5. Rezultati fenotipske detekcije produkcije β -laktamaza proširenog spektra duplim disk-difuzionim testom

Kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima detektovano je 20 ESBL pozitivnih izolata, sedam kod NDM pozitivnih i 13 kod OXA-48 pozitivnih izolata. Rezultati DDT testa za detekciju produkcije ESBL kod ovih izolata prikazani su u tabeli 5.29.

Tabela 5.29. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	DDT
13	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	+
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-
5	<i>E.cloacae</i>	NDM	+
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+
1	<i>E.coli</i>	NDM	+
9	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-
3	<i>E.cloacae</i>	NDM	-
2	<i>C.freundii</i>	NDM	-
1	<i>S.marcescens</i>	NDM	-
1	<i>E. aerogenes</i>	NDM	-
1	<i>M.morganii</i>	NDM	-

Kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji produkuju više tipova enzima detektovan je samo jedan ESBL pozitivan izolat, *Klebsiella pneumoniae* OXA 48/NDM pozitivan, a rezultati su prikazani u tabeli 5.30.

Tabela 5.30. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju više različitih tipova enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	Rezultat
6	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-
2	<i>E.cloacae</i>	OXA 48/NDM	-
1	<i>E. aerogenes</i>	OXA 48/NDM	-
1	<i>K.pneumoniae</i>	KPC/NDM	-
1	<i>E. cloacae</i>	KPC/OXA 48/NDM	-
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+

Kod karbapenemaza negativnih bakterija detektovana su tri ESBL pozitivna izolata i jedan AmpC pozitivan izolat (tabela 5.31).

Tabela 5.31. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza negativnih bakterija

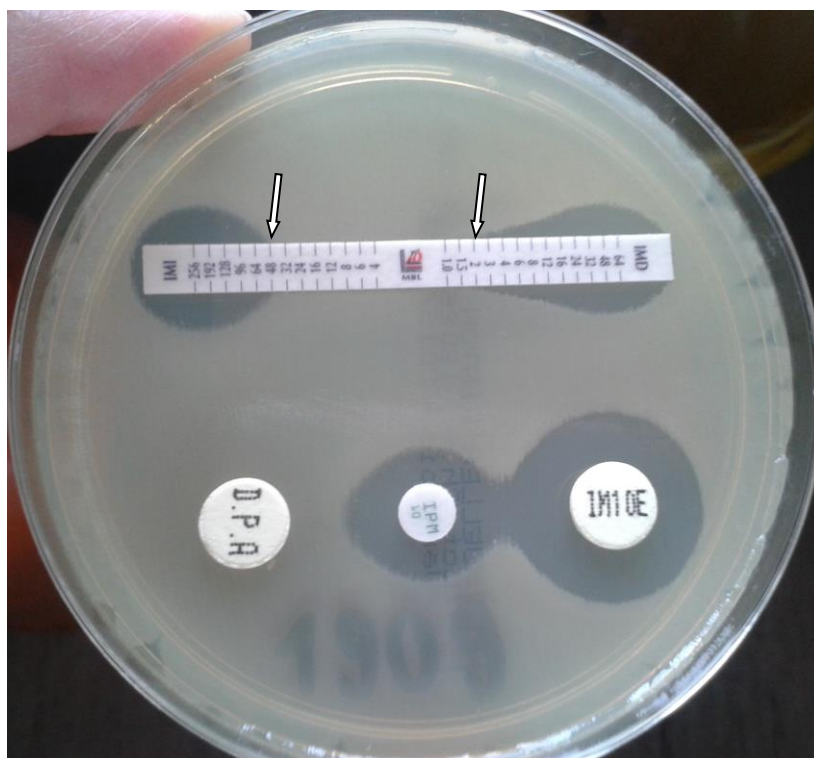
Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim (fenotipski)	Rezultat
1	<i>S.marcescens</i>	Amp C	-
1	<i>P.mirabilis</i>	ESBL	+
1	<i>S.marcescens</i>	ESBL	+
1	<i>E. aerogenes</i>	ESBL	+

Kod karbapenemaza pozitivnih enzima, najveći broj ESBL pozitivnih izolata bilo je kod OXA-48 produktora (13).

Senzitivnost i specifičnost nije mogla biti određena jer ESBL enzimi nisu potvrđeni genotipskim metodama.

5.1.4.6 Rezultati fenotipske detekcije produkcije metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom

Detekcija metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom zasnovano je na inhibiciji ovih enzima dejstvom EDTA. Pozitivan MIC MBL test kod NDM produkujuce *K.pneumoniae* prikazan je na slici 5.20.



Slika 5.20. Pozitivan MIC MBL test kod NDM pozitivnog izolata *K.pneumoniae*; IMI/IMD 48/2

Rezultati fenotipske detekcije metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju samo jedan tip enzima

Kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju samo NDM enzime test je kod samo dva od 24 izolata (jedan izolat *M. morgani* i jedan izolat *K.pneumoniae*) bio negativan, a u 22 od 24 izolata pozitivan. Kod OXA-48 pozitivnih izolata, nijedan nije dao pozitivan MIC test MBL. Rezultati MIC MBL testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju samo jedan tip enzima prikazani su u tabeli 5.32.

Tabela 5.32. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	MIC MBL test
9	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	+
9	<i>E. cloacae</i>	NDM	+
1	<i>S.marcescens</i>	NDM	+
1	<i>E.coli</i>	NDM	+
2	<i>C. freundii</i>	NDM	+
1	<i>M. morgani</i>	NDM	-
1	<i>K.pneumoniae</i>	NDM	-
16	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina; EDTA-etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina

Rezultati MIC MBL testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Test MIC MBL bio je pozitivan kod šest od 12 izolata karbapenemaza pozitivnih bakterija koje su proizvele više različitih tipova enzima. Rezultati ovog testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima prikazani su u tabeli 5.33.

Tabela 5.33. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	MIC MBL test
1	<i>E.cloacae</i>	KPC/OXA 48/NDM	+
1	<i>K.pneumoniae</i>	KPC/NDM	+
3	<i>E. cloacae</i>	OXA 48/NDM	+
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	+
6	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-

Rezultati MIC MBL testa kod karbapenemaza negativnih bakterija

Test MIC MBL bio je negativan kod svih karbapenemaza negativnih bakterija (nije bilo lažno pozitivnih rezultata). Rezultati ovog testa kod karbapenemaza negativnih bakterija prikazani su u tabeli 5.34.

Tabela 5.34. Test MIC MBL kod karbapenemaza negativnih bakterija

Broj izolata	Naziv bakterije	Enzim	Rezultat
1	<i>S.marcescens</i>	Amp C	-
1	<i>P.mirabilis</i>	ESBL	-
1	<i>S.marcescens</i>	ESBL	-
1	<i>E. aerogenes</i>	ESBL	-

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti MIC MBL testa sa EDTA

Najbolji rezultati dobijeni su za specifičnost (94,74%) i PPV (96,55%). Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za MIC MBL test prikazani su u tabeli 5.35.

Tabela 5.35. Senzitivnost i specifičnost kombinovanog disk testa sa EDTA

MIC MBL	PCR NDM		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	29	1	96,67%	
Negativan	8	18		69,23 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	78,38%	94,74 %		

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

5.1.4.7. Rezultati kolorimetrijskog testa za detekciju karbapenemaza

Za kolorimetrijsko dokazivanje karbapenemaza korišćen je RAPIDEC® CARBA NP test.

Od 56 ispitanih izolata, posle prvog očitavanja (nakon 30 minuta), test je bio pozitivan kod 32 karbapenemaza pozitivna, negativan kod 20 karbapenemaza pozitivnih izolata i negativan kod četiri karbapenemaza negativna izolata. Senzitivnost i specifičnost testa iznosila je 61,54% i 100,00%.

Posle drugog očitavanja (120 minuta), test je bio pozitivan kod 47 karbapenemaza pozitivnih, negativan kod sva četiri karbapenemaza negativna izolata (nije bilo lažno pozitivnih rezultata), a lažno negativan kod pet izolata. Od ukupno dvadeset lažno negativnih izolata posle prvog očitavanja (posle 30 minuta), petnaest izolata je pokazalo pozitivnost posle 120 minuta: tri NDM pozitivna izolata *K.pneumoniae*, deset OXA-48/NDM pozitivnih izolata *K.pneumoniae* (mukoidni sojevi), jedan OXA-48/NDM pozitivan izolat *K.pneumoniae* i jedan NDM pozitivan izolat *K.pneumoniae*. Poslednja dva izolata imala su MIK ertapenema/ meropenema/ imipenema 4/0,25/1µg/ml i NDM 8/0,25/1µg/ml (datim redom). Lažno negativni izolati su u najvećem broju bili zastupljeni kod OXA-48/NDM pozitivnih mukoidnih izolata *K.pneumoniae*. Senzitivnost i specifičnost testa time je posle 120 minuta povećana na 90,38% i 100,00%.

Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za Carba NP testa prikazani su u tabeli 5.36.

Tabela 5.36. Rezultati Carba NP testa

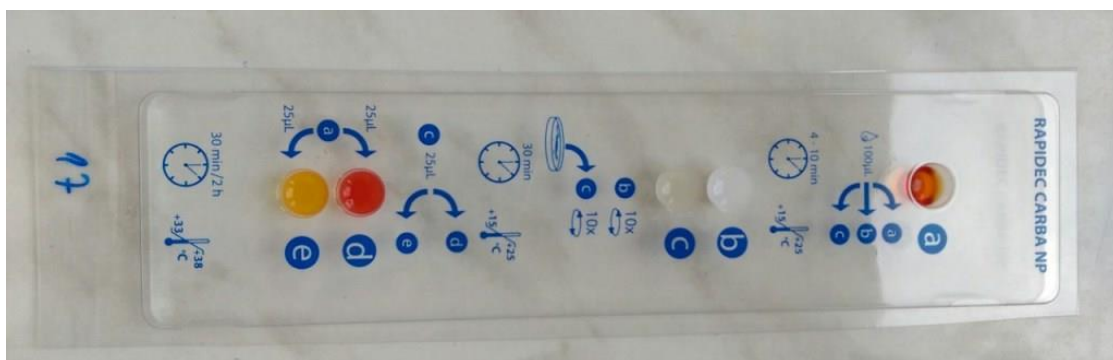
Procedura	Broj izolata nakon 30 minuta inkubacije	Broj izolata nakon 120 minuta inkubacije
Stvarno pozitivni	32	47
Stvarno negativni	4	4
Lažno pozitivni	0	0
Lažno negativni	20	5
Senzitivnost	61,54%	90,38%
Specifičnost	100,00%	100,00%
PPV	100,00%	100,00%
NPV	16,67%	44,44%

Rezultati lažno negativnog testa očitnog kod pet izolata posle 120 minuta prikazan je u tabeli 5.37.

Tabela 5.37. Struktura pet izolata karbapenemaza pozitivnih izolata negativnih posle 120 minuta

Broj izolata	Naziv bakterije	Karbapenemaza (PCR)	Rezultat
3	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48	-
1	<i>K.pneumoniae</i>	OXA 48/NDM	-
1	<i>S.marcescens</i>	NDM	-

Rezultati testiranja Carba NP testom prikazani su na slici 5.21.



Slika 5.21. Prikaz pozitivnog Carba NP testa

Tumačenje testa: pozitivan test- promena u boji suspenzije u komori „e” (testirani izolat) u odnosu na komoru „d” (kontrolna)

5.1.4.8. Rezultati fenotipske detekcije produkcije karbapenemaza određeni hromogenim podlogama

Pedeset šest izolata vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* testirano je chromID CARBA agarom, koji sadrži hranljivu bazu i tri hromogena supstrata koji omogućavaju detekciju karbapenemaza kod različitih Gram-negativnih bakterija.

Karbapenemaza pozitivni izolati pokazali su tipičan porast prema uputstvu proizvođača: *E.coli* (tamnocrvene kolonije) a *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* i *Citrobacter sp.*, plavo-zelene do sivo prebojene kolonije. *M. morganii* dala je braonkasto prebojene kolonije sa oskudnim porastom.

Od karbapenemaza negativnih izolata, *P. mirabilis* je dao vrlo oskudan porast bež kolonija sa braon haloom. Prema uputstvu proizvođača, ova podloga nije predviđena za detekciju produkora karbapenemaza u proteus grupi. Ostale karbapenemaza negativne bakterije nisu dale porast na ovoj podlozi.

Rezultati senzitivnosti i specifičnosti hromogenih podloga za detekciju karbapenemaza

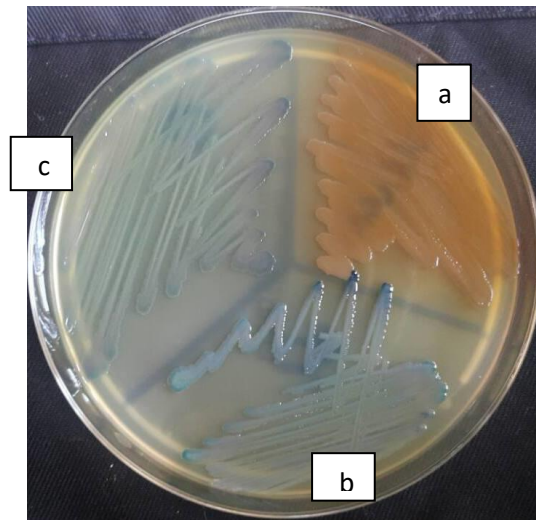
Najbolji rezultati dobijeni su za senzitivnost i PPV (98,08%). Rezultati određivanja senzitivnosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrednosti (PPV) i negativne prediktivne vrednosti (NPV) za chromID CARBA agar prikazani su u tabeli 5.38.

Tabela 5.38. Senzitivnost i specifičnost chromID CARBA agara

chromID CARBA agar	PCR		PPV	NPV
	Pozitivan	Negativan		
Pozitivan	51	1	98.08 %	
Negativan	1	3		75.00 %
	Senzitivnost	Specifičnost		
	98.08%	75.00 %		

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

Na slici 5.22. je prikazan porast karbapenemaza pozitivnih izolata na hromogenom agaru



Slika 5.22. Prikaz porasta na hromogenom agaru: a) braon prebojen izolat- *M.morganii*; b) plavo - *K.pneumoniae*, c) plavo-ljubičasto- *C.freundii*

5.2. Analiza izolata *Pseudomonas aeruginosa* genotipskim i fenotipskim metodama

5.2.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti vrste *Pseudomonas aeruginosa* na antimikrobne lekove

5.2.1.1. Osetljivost na antimikrobne lekove vrste *Pseudomonas aeruginosa* određena disk-difuzionom metodom

Rezultati dobijeni disk difuzionom metodom pokazali su da je 68% od 75 izolata *P.aeruginosa* bilo je rezistentno na imipenem a 67% izolata je bilo rezistentno na meropenem. Od ostalih AML najveća rezistencija zabeležena je kod cefepima 79% i gentamicina 78%, a najniža rezistencija bila je kod piperacilin-tazobaktama (32%). Od 75 izolata testiranih disk-difuzionom metodom svi (100%) su bili MDR.

Rezultati ispitivanja osetljivosti vrste *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na antimikrobne lekove prikazani su u tabeli 5.39.

Tabela 5.39. Procenat rezistencije izolata vrste *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na AML disk difuzionom metodom

Naziv antimikrobnog leka	Broj rezistentnih izolata	Procenat rezistentnih izolata
Cefepim	59	78,6
Gentamicin	58	78
Ciprofloksacin	56	74
Imipenem	51	68
Meropenem	50	66,6
Amikacin	44	58,6
Ceftazidim	42	56
Piperacilin-tazobaktam	24	32

5.2.1.2 Osetljivost na antimikrobne lekove vrste *Pseudomonas aeruginosa* određena minimalnom inhibitornom koncentracijom Vitek 2 sistemom

Minimalna inhibitorna koncentracija antimikrobnih lekova određivana je automatizovanim sistemom- Vitek2 Compact sistemom, karticom za ispitivanje osetljivosti Gram-negativnih bakterija na antibiotike AST-N240. Osetljivost ispitivanih izolata prikazana je na Tabeli 5.40.

Tabela 5.40. Osetljivost na AML *P.aeruginosa* određena AST-N240 karticom Vitek 2 sistema

Naziv AML	Osetljivost na AML (broj izolata)		
	R	I	S
Gentamicin	58	2	15
Ciprofloksacin	56	12	7
Imipenem	51	6	18
Meropenem	50	8	17
Cefepim	59	6	10
Amikacin	44	3	28
Ceftazidim	42	12	21
Piperacilin-tazobaktam	24	15	36

Senzitivan (S), intermedijarno osetljiv (I) i rezistentan (R)

Na osnovu minimalnih inhibitornih koncentracija određenih primenom Vitek2 sistema 51(68%) izolata bilo je rezistentno, 6(8%) intermedijarno osetljivo i 18(24%) senzitivno na imipenem. Na meropenem je bilo 50(67%) rezistentno, 8(10,6%) intermedijarno osetljivo i 17(30,35%) je bilo senzitivno. Od ostalih AML najveća rezistencija zabeležena je kod ciprofloksacina 56(74,6%) i gentamicina. Od 75 izolata svi (100%) su bili MDR.

Analizom rezultata dobijenih ispitivanjem osetljivosti na AML disk-difuzionom metodom i Vitek2 sistemom zabeležene su *minor* greške (razlika u rezultatu testiranja dvema metodama u okviru susednih kategorija- S/I ili I/R) u određivanju kategorija osetljivosti za ciprofloksacin. Rezistencija na ciprofloksacin disk-difuzionom metodom u odnosu na Vitek 2 bila je 59 od 58. U ovom slučaju zabeleženo je strože kategorisanje disk difuzionom metodom.

5.2.2. Fenotipovi rezistencije kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

Najčešći fenotipovi rezistencije bili su (1) izolati rezistentni na sve testirane AML osim piperacilin-tazobaktama i kolistina (28%), (2) izolati rezistentni na sve testirane AML osim kolistina (26,67%) (3) izolati rezistentni na sve testirane AML osim ceftazidima, cefepima piperacilin-tazobaktama i kolistina Svi fenotipovi prikazani su u tabeli 5.41.

Tabela 5.41. Najčešći fenotipovi rezistencije *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

Antimikrobni lekovi								broj izolata	% izolata
CAZ	FEP	TZP	IMP	MEM	GM	AK	CIP		
R	R	S/I	R	R	R	R	R	21	28.00
R	R	R	R	R	R	R	R	20	26.67
S/I	S/I	S/I	R	R	R	R	R	10	13.33
S/I	S/I	S/I	R	R	S/I	S/I	S/I	3	4.00
R	R	R	R	R	R	R	S/I	9	12.00
Ostali fenotipovi rezistencije								12	16.00
Ukupno								75	100.00

TZP: piperacilin-tazobaktam, CAZ: Ceftazidim, FEP: cefepim, IMP: imipenem, MEM: meropenem, GM: gentamicin, AK: amikacin, CIP: ciprofloksacin

Senzitivni (S), intermedijarno osetljivi (I) i rezistentni (R);S/I-senzitivni ili intermedijarno osetljivi

Analizom datih 75 izolata upoređivani su markeri rezistencije da bi se smanjila verovatnoća klonalnog porekla izolata.

Selekcija izolata *P.aeruginosa* za dalju fenotipsku i genotipsku analizu vršena je *screening* metodom detekcije potencijalnih produktora karbapenemaza sa graničnom vrednošću $MIK > 8 \mu\text{g/ml}$ za imipenem.⁸⁵

Za dalju analizu je na osnovu ovog kriterijuma izdvojeno 14 izolata.

Osetljivost na antimikrobne lekove određena je Vitek 2 sistemom korišćenjem AST N240 kartice. Kategorije osetljivosti (S/I/R) definisane su na osnovu MIK vrednosti izraženih u $\mu\text{g/ml}$, i rezultati su prikazani u tabeli 5.42.

Tabela 5.42. Distribucija MIK vrednosti određenih Vitek 2 AES sistemom za ispitivane AML

Redni broj izolata	Antimikrobni lekovi								
	MEM	IMP	TZP	CAZ	FEP	GM	AK	CIP	CS
1	≥ 16	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	≥ 64	≥ 16	8	≥ 4	≤ 0.5
2	≥ 16	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 4	≤ 0.5
3	8	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	32	≥ 16	16	≥ 4	4
4	≥ 16	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	≥ 64	≥ 16	8	≥ 4	≤ 0.5
5	2	≥ 16	$\geq 128/2$	8	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 4	≤ 0.5
6	≥ 16	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	32	≥ 16	≥ 64	1	≤ 0.5
7	≥ 16	≥ 16	32	≥ 64	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 4	≤ 0.5
8	≥ 16	≥ 16	32	≥ 64	≥ 64	≥ 16	32	≥ 4	≤ 0.5
9	≥ 16	≥ 16	≥ 64	32	≥ 64	≥ 16	≥ 64	≥ 4	≥ 16
10	4	≥ 16	4	2	≤ 1	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	1
11	≥ 16	≥ 16	16	≥ 64	≥ 64	≥ 16	16	≥ 4	≤ 0.5
12	≥ 16	≥ 16	16	8	8	≥ 16	≥ 64	≥ 4	≤ 0.5
13	4	≥ 16	8	4	2	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	≤ 0.5
14	8	≥ 16	$\geq 128/2$	≥ 64	16	≤ 2	≤ 1	≤ 0.25	≤ 0.5

TZP: piperacilin-tazobaktam, CAZ: ceftazidim, FEP: cefepim, IMP: imipenem, MEM: meropenem, GM: gentamicin, AK: amikacin, CIP: ciprofloksacin, CS: kolistin

Analiza antimikrobne osetljivosti ove grupe je dala sledeće rezultate:

- penicilini i cefalosporini: samo dva izolata bila su osetljiva na piperacilin-tazobaktam; samo dva izolata bila su osetljiva na cefepim i ceftazidim.

- karbapenemi: svi izolati bili su rezistentni na imipenem; na meropenem je jedan izolat bio senzitivna i dva intermedijarno osetljiva; ostalih 11 bilo je rezistentno (svi osim jednog izolata imali su $\text{MIK} \geq 16\mu\text{g}$);

-aminoglikozidi: sedam izolata je bilo senzitivno na amikacin, jedan intermedijarno osetljiv i šest rezistentnih, od kojih su svi imali visoku vrednost MIK ($\geq 64\mu\text{g}$); na gentamicin su bila tri senzitivna i 11 rezistentnih, od kojih su svi su svi imali visoku vrednost MIK ($\geq 16\mu\text{g}$).

-hinoloni: četiri izolata bilo je osetljivo na ciprofloksacin, a ostalih 10 bilo je rezistentno ($\text{MIK} \geq 4\mu\text{g}$).

-Kolistin: jedan izolat bio je rezistentan na kolistin ($\text{MIK} \geq 4\mu\text{g}$).

Svi ispitivani izolati bili su multirezistentni.

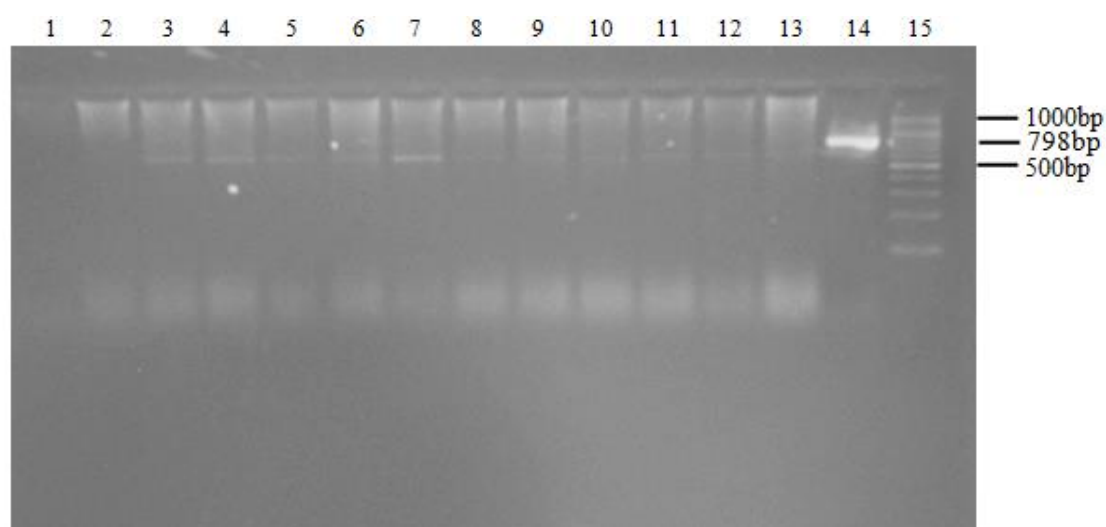
5.2.3. Rezultati genotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Kod izolata *P.aeruginosa* rezistentnih na karbapeneme određivano je PCR metodom prisustvo *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} i *bla*_{NDM} gena.

5.2.3.1. Zastupljenost gena koji kodiraju sintezu karbapenemaza PCR metodom

Na slikama 5.23-5.26. prikazana je elektroforeza PCR produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} i *bla*_{NDM} gena.

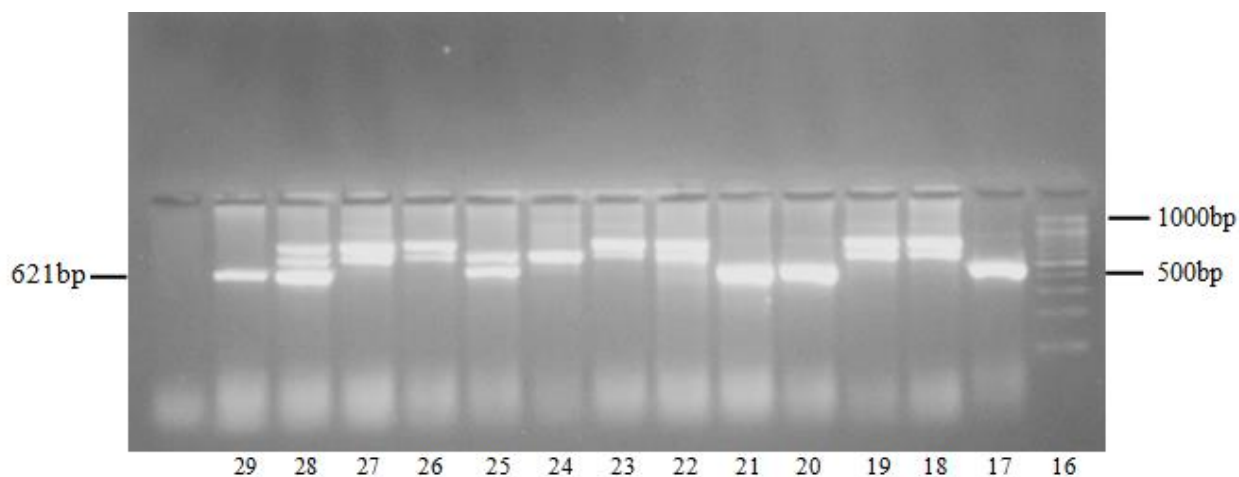
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC} gena prikazana je na slici 5.23.



Slika 5.23. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC} gena

Od 1 do 13- izolati *P.aeruginosa* kod kojih je dokazano odsustvo *bla*_{KPC} gena; 14-*K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla*_{KPC} -798bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

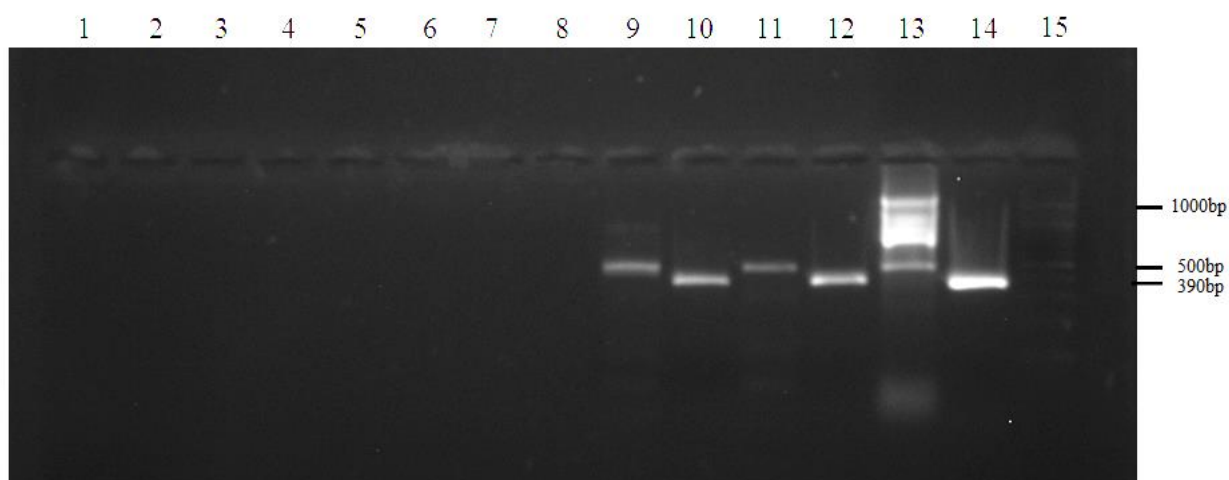
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{NDM}* gena prikazana je na slici 5.24.



Slika 5.24. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{NDM}* gena

20, 21, 25, 28 i 29- izolati *P.aeruginosa* kod kojih su dokazani *bla_{NDM}* geni; 17- *K.pneumoniae* NCTC 13440- pozitivna kontrola za *bla_{NDM}* -621bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase(O Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

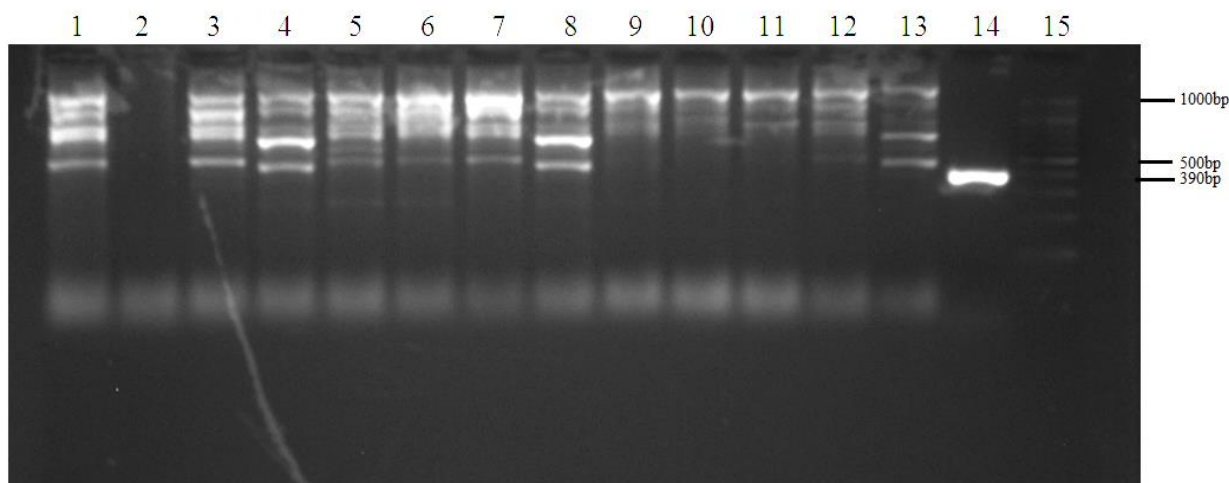
Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena prikazana je na slici 5.25.



Slika 5.25. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena

9,11,13- izolati *P.aeruginosa* kod kojih je dokazano odsustvo *bla_{VIM}* gena; 10,12,14- *K.pneumoniae* NCTC 13440- pozitivna kontrola za *bla_{VIM}* -390bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase(O Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena prikazana je na slici 5.26.



Slika 5.26. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla_{VIM}* gena

Od 1do13- izolati *P.aeruginosa* kod kojih je dokazano odsustvo *bla_{VIM}* gena; 14-*K.pneumoniae* NCTC 13438- pozitivna kontrola za *bla_{VIM}* - 390bp; 15- 100bp ladder- marker molekulske mase (O Range Ruler™ 100bp DNA Ladder)

Prisustvo *bla_{NDM}* gena koji kodiraju karbapenemaze tipa NDM detektovano je PCR metodom kod šest od ispitivanih 14 izolata, dok je dokazano odsustvo *bla_{KPC}* i *bla_{VIM}* gena koji kodiraju karbapenemaze tipa VIM i KPC kod svih ispitanih izolata.

5.2.3.2 Osetljivost ispitivanih izolata *Pseudomonas aeruginosa* na karbapeneme Vitek2 sistemom

Vitek2 metodom određena je osetljivost na antimikrobne lekove karbapenemaza pozitivnih izolata vrste *P.aeruginosa*. MIK za AML određivan je Vitek 2 AST N240 karticom. Osetljivost na karbapeneme prikazana je u tabeli 5.43.

Tabela 5.43. Osetljivost na karbapeneme svih 14 ispitivanih izolata *P.aeruginosa*

Karbapenemaza (PCR)	Broj izolata	Imipenem MIK (µg/ml)	Meropenem MIK (µg/ml)
NDM	6	≥16	4- ≥16
-	8	≥16	2- ≥16

5.2.4 Rezultati fenotipskih metoda za detekciju produkcije karbapenemaza kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

5.2.4.1 Zastupljenost karbapenemaza određena Vitek 2 AES sistemom

Ispitivanje fenotipova rezistencije pomoću Vitek2 AES sistema korišćenjem AST N240 kartice kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* pokazalo je različite fenotipove. Produkcija karbapenemaza Vitek2 AES sistemom korektno je definisana u četiri od šest izolata kod kojih su PCR metodom dokazani *bla_{NDM}* geni kao produktori karbapenemaza. Kod dva karbapenemaza pozitivna izolata mehanizam rezistencije na karbapeneme definisan je u kao produkcija AmpC enzima sa nepropustljivošću spoljne membrane- lažno negativni izolati.

Kod osam karbapenemaza negativnih izolata, pet izolata je Vitek2 AES sistemom identifikovano kao produkcija AmpC enzima sa nepropustljivošću spoljne membrane, dok su tri izolata definisana kao nepropustljivost spoljne membrane- nije bilo lažno pozitivnih rezultata. Od četiri izolata fenotipski definisana kao ESBL pozitivni, nijedan nije bio prepoznat od strane Vitek2 AES sistema. Rezultati Vitek 2 AES sistema za fenotipsku detekciju produkcije karbapenemaza u odnosu na rezultate dobijene PCR metodom prema vrsti enzima prikazani su u tabeli 5.44.

Tabela 5.44. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema vrsti enzima

PCR		VITEK 2 AES fenotip	
Karbapenemaza pozitivni izolati(broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati (broj)	
NDM (6)	(4) CP	(2) AmpC+IMPER	
Karbapenemaza negativni izolati (broj)	Karbapenemaza pozitivni izolati (broj)	Karbapenemaza negativni izolati(broj)	
ESBL (1)	/	1 AmpC+IMPER	
AmpC (4)	2	2 AmpC+IMPER	
ESBL (3)	/	3 IMPER	

IMPER- nepropustljivost- (engl.-*impermeability*-), CP- karbapenemaza (engl.- *carbapenemase*)

5.2.4.2. Rezultati fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza

Za dokazivanje karbapenemaza ovim testom korišćeno je istovremeno testiranje diska imipenema sa diskovima EDTA, dipikolonične kiseline, boronične kiseline i kloksacilina. Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.45.

Tabela 5.45. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa*

Broj izolata	Karbapenemaza (PCR)	BOR	CLOXA	DPA	EDTA
2	NDM	+	+	+	+
3	NDM	-	-	+	+
1	NDM	-	-	+	-

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina; EDTA-etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina

Kod karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa* u fenotipskom testu sinergizma od šest NDM pozitivnih izolata, dva su proizvela i AmpC enzime i nije bilo ESBL pozitivnih izolata. DPA test je kod svih izolata bio pozitivan, dok je EDTA bio pozitivan u pet od šest izolata (jedan izolat bio je lažno negativan).

Rezultati fenotipskog testa sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.46.

Tabela 5.46. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa*

Broj izolata	Enzim (fenotipski)	BOR	CLOXA	DPA	EDTA
2	AmpC	+	+	+	+
3	ESBL	-	-	+	+
1	-	-	-	+	+
1	ESBL/AmpC	+	+	+	-
1	-	-	-	-	-

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina; EDTA-etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina

Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* dao je sledeće rezultate: dva AmpC pozitivna izolata imala su pozitivan DPA test i EDTA test, tri ESBL

pozitivna izolata, pokazala su pozitivne EDTA i DPA testove, jedan izolat imao je pozitivan DPA i EDTA test, jedan izolat bio pozitivan na produkciju i ESBL i AmpC enzima i pozitivan DPA test, i kod jednog izolata su svi testovi bili negativni. Sedam od osam karbapenemaza negativnih izolata bilo je lažno pozitivno testom DPA, i šest od osam testom EDTA.

5.2.4.3. Zastupljenost metalo-beta laktamaza određena fenotipskim ispitivanjem diskom aztreonama

Osetljivost na disk aztreonama uz pozitivne testove na DPA i EDTA ukazuje na prisustvo MBL karbapenemaza. Testiranje diskom aztreonama dalo je pozitivne rezultate kod tri od šest NDM pozitivnih izolata. Kod jednog NDM pozitivnog izolata prisustvo AmpC enzima dalo je rezistenciju na aztreonam, pa uprkos pozitivnim testovima na MBL test sa diskom aztreonama nije mogao biti tumačen, i kod dva izolata takođe je zabeležena rezistencija na aztreonam bez prisustva ESBL ili AmpC.

5.2.4.4. Rezultati kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza

Ispitivanje produkcije karbapenemaza CDT metodom vršeno je komercijalnim testom-KPC/Metallo-beta-lactamase and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica).

Kombinovani disk test (CDT) kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa* je u pet od šest slučajeva dao pozitivan rezultat kod DPA i EDTA. Jedan izolat je bio negativan za sve testove, a svi CDT testovi bili su pozitivni kod dva izolata koja su pokazala istovremenu produkciju AmpC enzima. Rezultati kombinovanog disk testa kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.47.

Tabela 5.47. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa*

Broj izolata	Karbapenemaza (PCR)	CDT BOR	CDT CLOXA	CDT DPA	CDT EDTA
3	NDM	-	-	+	+
2	NDM	+	+	+	+
1	NDM	-	-	-	-

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina;

Od karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa*, kod jednog izolata svi CDT testovi bili su negativni. Test boronične kiseline i kloksacilina koji su indikatori produkcije AmpC enzima bili

su pozitivni kod četiri izolata, a DDT test za detekciju ESBL enzima kod pet izolata. Sedam karbapenemaza negativnih izolata bilo je lažno pozitivno na produkciju MBL enzima- pozitivni samo na DPA test, i šest od osam karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* bilo je lažno pozitivno u testu CDT sa EDTA. Rezultati kombinovanog disk testa kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.48.

Tabela 5.48. Kombinovani disk test kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa*

Broj izolata	Enzim (fenotipski)	CDT BOR	CDT CLOXA	CDT DPA	CDT EDTA
3	ESBL	-	-	+	+
1	ESBL	+	+	+	+
1	ESBL/AmpC	+	+	+	-
2	Amp C	+	+	+	+
1	-	-	-	-	-

BOR-boronična kiselina; CLOXA-kloksacilin; DPA-dipikolonična kiselina;

5.2.4.5. Rezultati fenotipske detekcije produkcije metalo- β -laktamaza MIC MBL test trakom

Kod svih karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa* MIC MBL test je dao pozitivne rezultate. Količnik je u svim slučajevima bio >20. Rezultati testiranja MIC MBL test trakom kod karbapenemaza pozitivnih izolata vrste *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.49.

Tabela 5.49. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih izolata vrste *P.aeruginosa*

Broj izolata	Karbapenemaza (PCR)	MIC MBL	Rezultat
2	NDM	256/3	+
1	NDM	256/1	+
1	NDM	256/4	+
1	NDM	256/6	+
1	NDM	256/12	+

Test traka za dokazivanje metalo- β -laktamaza (MIC MBL test) je kod sedam od osam karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* dao pozitivne rezultate. Količnik je u svim

slučajevima bio >20. Rezultati testiranja MIC MBL test trakom kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* prikazani su u tabeli 5.50.

Tabela 5.50. Test MIC MBL kod karbapenemaza negativnih izolata vrste *P.aeruginosa*

Broj izolata	Karbapenemaza (PCR)	MIC MBL	Rezultat
2	ESBL	256/12	+
2	ESBL	256/3	+
1	ESBL/AmpC	256/2	+
1	AmpC	256/12	+
1	-	96/2	+
1	AmpC	256/64	-

5.2.4.6. Rezultati kolorimetrijskog testa za detekciju karbapenemaza

Za kolorimetrijsko dokazivanje karbapenemaza korišćen je RAPIDEC® CARBA NP test (BioMerieux). Od 14 ispitanih izolata, posle prvog očitavanja (30 minuta), test je bio pozitivan kod 3 i lažno negativan kod tri od šest karbapenemaza pozitivnih izolata. Kod svih osam karbapenemaza negativnih izolata test je bio negativan. Posle drugog očitavanja (120 minuta), test je bio pozitivan kod 4 NDM pozitivna i jednog NDM negativnog izolata. Zabeležena su dva lažno negativna rezultata i jedan lažno pozitivan rezultat. Rezultat kolorimetrijskog testa za dokazivanje karbapenemaza (Carba NP) prikazan je u tabeli 5.51.

Tabela 5.51. Rezultat kolorimetrijskog testa za dokazivanje karbapenemaza

Redni broj izolata	Karbapenemaza (PCR)	Rezultat	
		30min.	120min.
1	NDM	-	+
2	NDM	+	+
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	NDM	+	+
8	NDM	-	-
9	NDM	+	+
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	+
14	NDM	-	-

5.2.4.7. Rezultati fenotipske detekcije produkcije karbapenemaza određeni hromogenim podlogama

Četrnaest izolata izolata *P.aeruginosa* testirano je zasejavanjem na chromID CARBA agar. Karbapenemaza pozitivni izolati pokazali su tipičan porast prema uputstvu proizvođača-porast sa prisustvom braon-zelenog pigmenta. Porast je zabeležen kod svih testiranih izolata (svih osam karbapenemaza negativnih izolata bilo je lažno pozitivno).

6 DISKUSIJA

Enterobacteriaceae, porodica Gram-negativnih bacila sa velikim brojem vrsta koje izazivaju infekcije u humanoj medicini, prisutne su kao deo mikroflore u organizmu ljudi i životinja, ali i u zemljištu i vodi. Pripadnici ove bakterijske familije jedan su od najčešćih uzročnika infekcija u bolničkim sredinama.²⁵⁷

Njihov patogeni potencijal od posebnog je značaja u infekcijama pacijenata kod kojih postoji osnovno oboljenje ili trauma. To se posebno odnosi na pacijente u jedinicama intenzivne nege, kao i stanja posle operativnih zahvata, uključujući i transplantacije, pacijente obolele od malignih bolesti i imunodeficientne pacijente. Produžen boravak u bolnici, invazivne procedure i primena stalnih ili privremenih katetera i proteza predstavljaju dodatne faktore rizika za infekciju enterobakterijama.²⁵⁸ Neke studije ukazuju na visoku prevalencu infekcija u jedinicama intenzivne nege (51%). Mortalitet kod inficiranih pacijenata dva puta je veći nego kod pacijenata bez infekcije.²⁵⁹

Mnogi faktori utiču na nastanak i razvoj rezistencije kod enterobakterija. Prekomerna i neracionalna upotreba antibiotika, posebno širokog spektra delovanja, uključujući i karbapeneme, jedan je od najvažnijih faktora nastanka enterobakterija rezistentnih na karbapeneme. Široka rasprostranjenost, veliki broj genetski srodnih vrsta i mogućnost horizontalne transmisije gena rezistencije u bakterijskoj populaciji, kao i migracije stanovništva, doprinose širenju rezistentnih sojeva. Jedan od najznačajnijih mehanizama rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija je enzimski- produkcija karbapenemaza, enzima koji u većoj ili manjoj meri hidrolizuju karbapeneme.

Infekcije uzrokovane CRE udružene su sa visokom mortalitetom. Zavisno od kliničkih studija, mortalitet se kreće od 22-72%, i uslovljen je mnogim faktorima, kao što su komorbiditet, invazivne procedure ili nedostatak adekvatne antimikrobne terapije.^{14, 260} Invazivne infekcije uzrokovane ovim bakterijama povezane su sa visokim morbiditetom i mortalitetom.^{123, 6, 9, 15, 16} Enterobakterije koje proizvode karbapenemaze rezistentne su na skoro sve beta-laktamske antibiotike, uključujući i karbapeneme. Poseban problem predstavlja i udružena rezistencija na druge AML koji se koriste u terapiji infekcija izazvanih ovim bakterijama, kao što su aminoglikozidi, fluorohinoloni, trimetoprim-sulfametoksazol, a u novije vreme i kolistin i tigeciklin.¹²⁴ Najčešće su multirezistentne, ali se među njima detektuju i ekstremno rezistentni

(XDR) i panrezistentni (PDR) sojevi. Ova pojava značajno umanjuje terapijske mogućnosti, i vrlo mali broj AML ostaje na raspolaganju za lečenje ovakvim sojevima, a to su, u najvećem broju slučajeva, tigeciklin, kolistin, amikacin i fosfomicin. Uprkos dobrom efektu u testiranju *in vitro* ovih AML, često se beleži terapijski neuspeh.²⁶¹

Globalna rasprostranjenost enterobakterija koje proizvode karbapenemaze razlikuje se zavisno od tipa enzima. Najvažniji rezervoar NDM enzima su Indija i Balkan, KPC enzimi su najčešći u SAD, Izraelu, Grčkoj i Italiji a Turska i zemlje severne Afrike endemske su za OXA-48 enzime. Enzimi KPC se još uvek najčešće javljaju u bolničkim izolatima *K.pneumoniae*, a NDM enzimi se detektuju u bolničkim ali i u vanbolničkim izolatima *K.pneumoniae* i *E. coli*, kao i kod drugih vrsta porodice enterobakterija. Takođe, NDM i KPC enzimi javljaju se kod enterobakterija ali i kod nefermentativnih bakterija, dok su OXA-48 enzimi karakteristični za enterobakterije.²⁶²

Glavne epidemiološke karakteristike sojeva koji proizvode karbapenemaze su geografska distribucija, koja uključuje i postojanje primarnog rezervoara, genetski determinisane osobine i mobilnost stanovništva na područjima gde se ovakvi sojevi detektuju.

Verovatnoća da će se neki od ovih enzima pojaviti u bakterijskoj vrsti na određenom geografskom području definiše se kao primarni rezervoar i zavisi od parametara koji predstavljaju povoljne preduslove, kao što su velika gustina naseljenosti, povoljni klimatski uslovi, loše higijenske navike stanovništva kao i prekomerna i neracionalna upotreba antibiotika. Karakteristike genetskih struktura koje sadrže gene rezistencije za produkciju karbapenemaza su takođe od značaja sa epidemiološkog aspekta. Mobilne genetske strukture, kao što su plazmidi ili transpozoni, favorizuju horizontalni genetski transfer. Pojedini plazmidi mogu se replikovati u različitim bakterijskim vrstama, što omogućava prenos gena među njima. Neki bakterijski sojevi pokazuju sposobnost za opstanak u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, ali i jednostavnu transmisiju u ljudskoj populaciji (takozvani “uspešni klonovi”- *engl.- successful clones*). Ukoliko ovakvi klonovi poseduju gene koji kodiraju karbapenemaze, širenje gena biće omogućeno karakteristikama samog klona. Mobilnost populacije u kojoj je rezervoar formiran je parametar koji omogućava globalnu distribuciju karbapenemaza. Izražene migracije (posao, turizam, medicinski turizam), u nekom geografskom području uslovljavaju povećanu mogućnost prenosa genetskih determinanti, čak i u vrlo udaljene regije. Najčešće se kod pripadnika porodice *Enterobacteriaceae* detektuju OXA-48, KPC, VIM-1 i NDM-1 enzimi (enzimi “velike četvorke”).²⁶³

Naše istraživanje potvrdilo je PCR metodom prisustvo tri različita gena za sintezu enzima koji hidrolizuju karbapeneme, i to *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} i *bla*_{KPC} gena. Prisustvo gena za sintezu

karbapenemaza u izolatima enterobakterija i vrste *P.aeruginosa* definisalo ih je kao kao NDM, OXA-48 i KPC pozitivne izolate.

Molekularna klasifikacija karbapenemaza, zasnovana na upoređivanju nukleotidnih i amino kiselinskih sekvenci iz tih enzima definiše tri klase (A, B i D) po Ambleru.⁹⁴ Klase A i D su serin-vezujući enzimi, a klasa B su metalo- β -laktamaze (MBL), za čiju su aktivnost potrebni cinkovi joni. Značajan broj β -laktamaza iz sve tri molekularne klase nalazi se kod enterobakterija i kod vrste *P.aeruginosa*.⁹⁶

Klasa A obuhvata šest grupa enzima: GES, KPC, SME, IMI, NMC-A i SFC.

Rezistencija na karbapeneme uslovljena ovim enzimima može biti hromozomskog (NMC-A, SME, IMI-1, SFC-1) ili plazmidskog porekla (KPC, IMI-2, GES). Geni *bla*_{GES} nalaze se na genskim kasetama integra 1a, *bla*_{KPC} geni i *bla*_{IMI-2} gen smešteni su na transpozonima ili plazmidima. Enzimi klase A hidrolizuju aminopeniciline, ureidopeniciline, cefalosporine prve i druge generacije, aztreonam, ertapenem, imipenem i meropenem, a ne deluju na cefamicine (cefoksitin). Osim KPC enzima, ostali predstavnici ove klase slabo hidrolizuju karbapeneme, pa retko uzrokuju klinički značajnu rezistenciju. Klavulanska kiselina, tazobaktam i sulbaktam ih varijabilno inhibiraju.⁹⁴

Klinički najznačajniji enzimi klase A su KPC enzimi (*engl.- K.pneumoniae carbapenemase*). Prva, KPC-1, identifikovana je 2001. godine u izolatu *K.pneumoniae* iz 1996. godine na istočnoj obali SAD.¹⁰⁹ Nakon KPC-1 opisane su i druge dve alelske varijante: KPC-2 i KPC-3^{110, 111} a ukupno su detektovane 22 varijante⁹⁹ od kojih je KPC-2 najčešća. Za nekoliko godina, proširile su se na skoro celu teritoriju SAD, sa dominacijom u istočnom delu zemlje. Na području Njujorka smatraju se endemičnim, a do danas su opisane širom sveta.^{112, 113, 114} Produktori karbapenemaza su najčešće detektovani kao izazivači hospitalnih infekcija, ali se mogu naći i među izolatima iz ambulantnih uzoraka. Smrtnost od infekcija izazvanih KPC produktorima je visoka (preko 50%). Osim rezistencije na karbapeneme, ova pojava vezana je i za udruženu rezistenciju na druge antimikrobne lekove (multirezistenciju). Najzastupljenije su kod roda *Klebsiella sp.*, ali su u manjem broju prisutne i kod drugih predstavnika porodice enterobakterija. Enzimi KPC opisani su kod *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *S. marcescens*, *C. freundii*, ali i kod nefermentativnih bakterija kao što su *Pseudomonas spp.* i *Acinetobacter spp.*^{115, 27} Osim istočne obale SAD-a, endemski se javljaju i u nekim delovima Južne Amerike -u Kolumbiji i Argentini,²⁶⁴ a detektovani su i u Meksiku.²⁶⁵ Od ostalih mogućih sekundarnih rezervoara u svetu, takođe treba pomenuti Izrael,¹¹⁹ kao i Kinu,¹²¹ gde

pacijenti kod kojih su izolovani KPC produktori nisu imali kontakta sa američkim kontinentom. Što se Indije tiče, KPC enzimi se u izolatima javljaju ređe u odnosu na NDM i OXA-48 enzime.²⁶⁶

Podaci EuSCAPE studije (*engl.- European spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*) iz 2015. godine ukazuju na KPC kao najšire rasprostranjenu karbapenemazu klase A u Evropi. U Italiji i Grčkoj konstatovana je endemska situacija. Rasprostranjenost KPC i OXA-48 enzima ne mora nužno da se preklapa, jer ima regija gde dominira samo jedan od ova dva tipa enzima: u Grčkoj preovlađuju KPC enzimi, a OXA-48 enzimi se javljaju ređe, dok je u Turskoj i na Malti situacija obrnuta- dominiraju OXA-48 enzimi, a KPC enzimi pojavljuju se sporadično.⁶⁵

U Evropi su endemska područja za produktore KPC enzima Italija i Grčka,²⁶⁴ i kao potencijalno endemsko žarište Poljska,²⁶⁷ u kojoj se često opisuju hospitalne epidemije izazvane enterobakterijama koje produkuju KPC enzime. Na teritoriji Poljske ovi enzimi javljaju se pojedinačno ili istovremeno sa nekim drugim tipom karbapenemaza, kao što je NDM enzim. Albiger i saradnici upozoravaju na problem diseminacije KPC enzima u Slovačkoj. Prvi slučaj KPC-2 enzima registrovan je krajem 2013. godine u izolatu kod pacijenta koji je prethodno boravio u Grčkoj. Ovaj soj se raširio u više od deset slovačkih bolnica, a više od 150 inficiranih ili kolonizovanih pacijenata registrovano je do danas.²⁶³ Istraživači iz Mađarske prvi KPC-2 pozitivni izolat vrste *K.pneumoniae* rezistentne na kolistin izveštavaju 2008. godine, u izolatu pacijenta koji je boravio u Grčkoj.²⁶⁸ Osterblad sa saradnicima u Finskoj registruje prvu epidemiju KPC pozitivnim sojem *K.pneumoniae* koja je imala klonalno poreklo (ST 512.)²⁶⁹

Osim distribucije na velikom delu evropskog kontinenta, KPC enzimi detektuju se i u ostalim delovima sveta. Jedan od razloga za ovako široku rasprostranjenost je i prisustvo gena koji kodiraju KPC-2 i KPC-3 enzim u ST 258 klonu *K.pneumoniae* koga karakterišu velike mogućnosti transmisije i otpornost na uslove spoljašnje sredine.¹²²

U ovom istraživanju dokazano je prisustvo *bla*_{KPC} gena. Ovaj gen detektovan je kod samo dva izolata, i to kod jednog izolata *E. cloacae* u kombinaciji sa *bla*_{OXA-48} i *bla*_{NDM} genom i kod jednog izolata *K.pneumoniae* u kombinaciji sa *bla*_{NDM} genom.

Metallo-β-laktamaze su klinički najvažnije karbapenemaze. Metallo-β-laktamaze (MBL)-pripadaju klasi B po Amblerovoj klasifikaciji. Kodirane su plazmidom ili integronom, mogu hidrolizovati sve β-laktame osim monobaktama (aztreonam) i ne inaktiviraju ih inhibitori β-laktamaza (klavulanska kiselina, tazobaktam i sulbaktam). Vrednost MIK na karbapeneme kod produktora MBL može varirati od senzitivnog do rezistentnog.¹²⁴ Stopa smrtnosti od infekcija izazvanih MBL pozitivnim sojevima kreće se od 18% do 67%.¹²⁵ U klasu metallo-β-laktamaza

spadaju: SPM¹⁶⁶, SIM¹⁶⁸, DIM¹⁷⁸, TMB²⁷⁰ i AIM²⁷¹, enzimi koji se češće javljaju kod *Acinetobacter spp.* i *P.aeruginosa*, i IMP, VIM, NDM, GIM, KHM, koji se javljaju i kod enterobakterija.⁹⁶ Geni koji ih kodiraju nalaze se u integronima gde su inkorporirani u genske kasete. Inkorporiranje integrona u sastav plazmida ili transpozona, omogućava prenos tih gena među bakterijskim rodovima i vrstama. Najšire rasprostranjene su VIM, IMP i NDM karbapenemaze,⁸⁵ dok se GIM²⁷² i KHM¹⁷⁹ javljaju sporadično i vezano za određeni region. Iako su rasprostranjeni širom sveta, VIM enzimi su karakteristični za Evropu (Italija, Grčka), a IMP enzimi za Daleki Istok (Japan, Tajvan, Kina).⁸⁵

Najrasprostranjenija MBL familija je VIM (*engl.- Verona-integron encoded metallo-β-lactamase*), sa 43 opisane varijante.⁹⁹ Ovi enzimi su deo genske kasete insertovane u integron koji omogućava njihovu diseminaciju. Sojevi koji produkuju ove enzime izazivaju sporadične infekcije, ali mogu izazvati i epidemije bolničkih infekcija. Enzim VIM-1 je prvi put otkriven u Veroni 1997. godine.¹⁴⁵ Ovaj enzim je otkriven u izolatima *E. cloacae*, *P. mirabilis*, *Providencia. stuartii* (*P. stuartii*) i *M. morgani* iz Grčke,^{146, 147} u izolatu *K.pneumoniae* i *P. stuartii* iz Francuske, kao i u izolatima *E. coli* i *K.pneumoniae* iz Španije. Najčešća varijanta je VIM-2 tip enzima.²⁶² Enzim VIM-2 je endemski u Južnoj Evropi i karakterističan je za zemlje Mediterana (Grčka, Španija, Italija) i jugoistočnu Aziju (Južna Koreja, Tajvan).^{150, 139} Na afričkom kontinentu, hospitalne epidemije i sporadični slučajevi beleže se u Južnoafričkoj republici, Tunisu, Obali Slonovače, i to kod vrste *P.aeruginosa*.²⁶²

Podaci iz Danske odnose se na pojedinačne slučajeve pojave CRE, koji su najčešće importovani, a Jakobsen i saradnici u periodu 2013.-2015. godine opisuju sporadične epidemije VIM-4 produkujće *E.coli*.²⁷³ U baltičkim zemljama (Estoniji, Latviji i Litvaniji) registruje se samo mali broj sporadičnih slučajeva GIM, NDM i VIM enzima.²⁷⁴ Austrijski istraživači u periodu od 2010. do 2015. beleže pojavu VIM enzima, pored KPC i OXA-48 enzima.²⁷⁵ Bogaerts i saradnici u Luksemburgu registruju sporadične slučajeve produkcije VIM-27 enzima kod izolata vrste *K.pneumoniae* importovanih iz Grčke, dok registrovanih epidemija u ovoj zemlji nije bilo.²⁷⁶ U studiji Patzer-a i saradnika iz 2004. godine nalazimo podatke o pojavi VIM-4 karbapenemaze kod vrste *P.aeruginosa* u Poljskoj u periodu od 1998-2001. godine.¹⁵⁷ Iste godine, mađarski autori¹⁵⁶ iznose podatke o izolatu *P.aeruginosa* rezistentnom na karbapeneme koji je produkovao VIM-4 enzim. Do 2008. je u ovoj zemlji registrovano oko 600 izolata koji su produkovali VIM-4 enzim, a taj trend se nastavlja i do danas, i predstavlja dominantnu MBL na ovom području.²⁶³ U Nemačkoj, VIM enzimi su na trećem mestu po učestalosti, posle OXA-48 i KPC-2 enzima.²⁶³

Prvi izolati CRE u Bugarskoj se detektuju od 2012. godine. Markovska sa saradnicima daje podatke o izolatu *K.pneumoniae* koja je proizvela VIM-1 i KPC-2 enzime, detektovanoj u Varni 2013. godine.²⁷⁷ Multicentrična studija u četiri velike hrvatske bolnice identifikovala je VIM-1 kao najčešće detektovan enzim, pored NDM i KPC enzima.²⁷⁸

U zemljama Mediterana, Francuska od 2009. godine beleži kontinuirani porast broja sporadičnih izolata pozitivnih na produkciju karbapenemaza, kao i epidemija koje su izazvane ovim bakterijama. Enzimi VIM su u 2014. godini, posle OXA-48 i NDM enzima detektovanih kod vrste *K.pneumoniae* i *E. coli*, najčešće detektovane karbapenemaze u Francuskoj.

Situacija u Španiji je alarmantna, jer se beleži porast broja proizvođača karbapenemaza poslednjih godina, kao i interregionalno širenje (karbapenemaze su detektovane u 34 od 50 španskih bolnica). Najčešće je prisutna OXA-48 i VIM-pozitivna *K.pneumoniae*, ali su karbapenemaze detektovane i kod *E. coli*.²⁷⁹ Od dve hiljadite godine, Grčka je suočena sa pojavom epidemija uzrokovanih poliklonalnim VIM pozitivnom sojem *K.pneumoniae*, kao i KPC-2 pozitivnim sojem *K.pneumoniae*.³⁴ Karbapenemaza VIM-1 je prvi put otkrivena kod vrste *K.pneumoniae*, a kasnije mnogi autori opisuju prisustvo ovog enzima i kod vrste *E. coli*, *E.cloacae*, *P.mirabilis*, *P. stuartii*, *M. morgani*,^{146,147} kao i kod vrste *C. freundii*, *Serratia liquifaciens* i *Klebsiella oxytoca*.²⁸⁰

Enzim VIM-12 je nađen u Grčkoj 2007. godine, u izolatu *K.pneumoniae*, a zatim i u izolatima *E. coli* i *E. cloacae*.¹⁶³ Podaci iz Italije govore o manjoj zastupljenosti VIM enzima u odnosu na KPC i NDM enzime u ovoj zemlji. Luzzaro i saradnici iznose podatke o detekciji VIM-4 u izolatima vrste *K.pneumoniae* i *E. cloacae* u Italiji kod bolesnika koji je prethodno lečen karbapenemima a boravio je u Grčkoj.¹⁵⁵

Prisustvo VIM enzima češće je u izolatima vrste *P.aeruginosa* u odnosu na njihovu pojavu kod enterobakterija. Enzim VIM-5 je opisan kod izolata iz Turske 2003. godine,¹⁵⁹ a VIM-6 enzim je detektovan u Singapuru 2000. godine, u izolatu vrste *Pseudomonas putida*.¹⁶⁰ Ostale varijante VIM enzima u izolatima vrste *P.aeruginosa* opisane su od strane mnogih autora. Alelske varijante VIM 8-11 i VIM-7 opisane su u SAD-u 2001.godine,^{161, 162} VIM-4 β-laktamaza je prvi put opisana u izolatima *P.aeruginosa* iz Grčke, a varijante VIM-13- 18 detektovane su u Španiji,¹⁶⁴ Bugarskoj i Nemačkoj.¹⁶⁵

U ovom istraživanju nije dokazano prisustvo VIM enzima ni u jednom izolatu ispitanih enterobakterija i vrste *P.aeruginosa*.

Jedna od novijih i sve rasprostranjenijih metalo- β -laktamaza je i NDM (*engl.- New Delhi metallo- β -lactamase*). Ovaj enzim najčešće se detektuje kod vrsta *E.coli* i *K.pneumoniae*, ali je registrovan i u drugim vrstama enterobakterija, kod i kod *P.aeruginosa* i *A.baumannii*. Opisano je 16 alelskih varijanti ovog enzima.⁹⁹

Genetska struktura NDM razlikuje se od drugih karbapenemaza. Ovaj enzim je najbližiji VIM-1/VIM-2 enzimima, ali je utvrđeno samo 32,4% aminokiselinskog poklapanja. NDM enzimi hidrolizuju sve β -laktamske antibiotike i karbapeneme, osim aztreonama.¹⁶⁹ U poređenju sa NDM-1 enzimom, NDM-4, NDM-5 i NDM-7 imaju jaču hidrolitičku sposobnost.^{281, 282, 283} Gen *bla_{NDM-1}* koji kodira NDM enzim nalazi se na plazmidima koji mogu sadržati i gene rezistencije na aminoglikozide, trimetoprim-sulfametoksazol, makrolide i rifampicin, kao i gene koji kodiraju ESBL, OXA-48, VIM enzime i plazmidske AmpC enzime, pa se tako stvaraju XDR ili panrezistentni sojevi.²⁸⁴

Jedna od karakteristika Gram-negativnih bacila koji produkuju NDM enzime je postojanje velikog broja sojeva koji su osetljivi samo na kolistin, tigeciklin i fosfomicin.²⁸⁵ Plazmidsko poreklo NDM enzima omogućava horizontalnu transmisiju ovih enzima u bakterijskoj populaciji.¹⁷⁵ Ako tome dodamo činjenicu da su ispunjeni i ostali epidemiološki uslovi za širenje NDM gena, a to je veličina rezervoara ovih enzima (Indijski potkontinent sa više od 1,4 milijarde ljudi od kojih veliki broj živi u lošim higijenskim uslovima), kolonizacija velikog broja ljudi bakterijama koje produkuju NDM (5-15%),²⁸⁶ kao i prisustvo NDM sojeva u površinskim vodama, zemljištu, pa čak i vodi za piće¹⁷³ dobijamo ogroman epidemiološki potencijal koji rezultuje globalnom diseminacijom i prisustvom ovih enzima u velikom delu sveta.

Za razliku od drugih MBL, *bla_{NDM-1}* gen nije vezan samo za jedan klon. Od posebnog je značaja otkrivanje prisustva NDM enzima u ST131 klonu ESBL pozitivne (CTX-M-15) *E.coli*,¹⁷⁶ koji je široko rasprostranjen i jedan je od najčešćih uzročnika vanbolničkih urinarnih infekcija i dijareja. Vanbolničke infekcije je vrlo teško kontrolisati u epidemiološkom smislu, što predstavlja dodatnu opasnost od širenja NDM enzima u bakterijskoj populaciji.²⁸⁷

Enzim NDM prvi put je detektovan u Švedskoj 2008. godine, kod pacijentkinje koja je u Nju Delhiju prethodno bila podvrgnuta medicinskom tretmanu.¹⁶⁹ Do 2010. godine pojava ovog enzima registruje se isključivo u Indiji ili se detektuje u izolatima registrovanim u Aziji, Australiji, Evropi ili Kanadi koji su vezani za boravak pacijenata u ovoj zemlji.¹⁷⁰ Posle 2010. godine u velikom broju studija potvrđuje se njihovo prisustvo u različitim delovima sveta. Veliki broj opisanih slučajeva odnosi se na NDM-1 pozitivne sojeve koji su u Evropu, Kanadu, SAD, Aziju i

Australiju preneti iz Indije.^{171, 172} Indijski potkontinent (Pakistan, Indija i Šri Lanka) glavni je rezervoar enterobakterija koje produkuju NDM enzim u svetu.²⁸⁷ Ni afrički kontinent nije ostao pošteđen prisustva ovih enzima.²⁸⁸

Novija istraživanja sve češće otkrivaju NDM enzime na Balkanu i Srednjem Istoku, koji potiču od izolata pacijenata bez anamnestičkih podataka o putovanju u zemlje indijskog potkontinenta. Ovo ukazuje na mogućnost postojanja „balkanskog klona”, autohtonog bakterijskog soja karakterističnog za navedena područja, koji na taj način postaje sekundarni rezervoar NDM enzima. Halabi i saradnici u svom istraživanju dokazuju pojavu NDM-1 enzima u Holandiji, u izolatu vrste *K.pneumoniae* kod pacijenta koji dolazi sa područja Balkana.²⁸⁹ Podaci istraživanja hrvatskih autora govore o prisustvu NDM-1 β-laktamaze u izolatu vrste *K.pneumoniae* dobijenom iz uzorka pacijenta iz Bosne i Hercegovine, bez anamnestičkih podataka o boravku u Indiji.¹⁷⁴ Arapsko poluostrvo takođe se može smatrati sekundarnim rezervoarom NDM enzima.^{290, 291}

U Evropi, epidemiološka situacija vezana za prisustvo New Delhi metalo-β-laktamaza (NDM) menja se u periodu 2013-2015. godine. Poslednji podaci govore o sporadičnim epidemijama u pet evropskih zemalja, dok sedam zemalja beleži interregionalno širenje NDM pozitivnih sojeva. Ni u jednoj zemlji ne registruje se endemska situacija.²⁶³

Jakobsen i saradnici u Danskoj beleže samo pojedinačne slučajeve pojave NDM-4 pozitivnog izolata vrste *E.coli*²⁹² poreklom sa Dalekog istoka (importovani slučajevi), dok su u Holandiji do skoro registrovane samo sporadične bolničke epidemije enterobakterija koje su produkovalе KPC, OXA-48 i NDM enzime.²⁶³

Studija EuSCAPE ukazuje na zabrinjavajuću situaciju u Belgiji, jer je broj slučajeva u periodu od 2012.-2015. godine udvostručen, a više od 80% slučajeva su autohtoni sojevi karbapenemaza pozitivnih enterobakterija. Posebno brinu epidemije izazvane autohtonim sojevima NDM, sa regionalnim i interregionalnim širenjem.²⁶³

Od skandinavskih zemalja, Norveška i Švedska beleže samo sporadične slučajeve detekcije NDM najčešće vezane za putovanja u druge zemlje.²⁹³ Pavelkovich sa saradnicima u baltičkim zemljama registruje takođe mali broj sporadičnih slučajeva GIM, NDM i VIM enzima,²⁷⁴ a u Irskoj istraživači izveštavaju samo sporadične slučajeve NDM izolata tek od 2013. godine.²⁹⁴

Prema podacima Evropske asocijacije za praćenje rezistencije na antimikrobne lekove (*engl.- Antimicrobial resistance interactive database-EARS-Net*) najmanji broj izolata registrovan je u Češkoj republici. Većina izolata dobijena je od pacijenata koji su boravili van zemlje (Grčka, Italija, Ukrajina).²⁹⁵ Registrovana je i jedna mala epidemija sredinom 2013. godine, izazvana NDM

pozitivnim sojevima *K.pneumoniae*.²⁹⁶ Slična situacija je i u Sloveniji, koja je do 2013. godine imala samo sporadične importovane slučajeve. Jedina epidemija zabeležena je 2014. godine, od strane Pirša i saradnika i izazvana je vrstama *E. coli* i *K.pneumoniae* koje su proizvele OXA-48 i NDM enzime poreklom od pacijenta koji je boravio u Libiji.²⁹⁷ U Poljskoj se 2015. zapaža smanjenje broja proizvođača KPC enzima i povećanje broja izolata *K.pneumoniae* kod kojih je dokazana produkcija NDM-1-enzima. Krajem 2012. godine Baraniak i saradnici izveštavaju o interregionalnoj epidemiji NDM pozitivnom *K.pneumoniae* u Poljskoj,²⁹⁸ najverovatnije izazvanom importovanim sojem od pacijenta koji je boravio u Africi. Slovačka je do 2013. godine registrovala samo dve lokalne epidemije izazvane NDM pozitivnim sojem *K.pneumoniae*,²⁹⁹ kao i jednu u 2015. godini.²⁶³

U Rumuniji Szekely sa saradnicima detektuje NDM-1 enzime, najčešće kod *K.pneumoniae*,³⁰⁰ dok podaci iz Bugarske govore o povećanoj učestalosti CRE od 2012. godine. Poirel i saradnici 2013. godine iznose podatke o lokalnoj epidemiji izazvanoj NDM-1 pozitivnim sojem *E. coli* u Vojnoj bolnici u Sofiji.³⁰¹

Iako je Turska endemsko područje za OXA-48 enzime, u ovoj zemlji detektuje se i pojava NDM enzima. Epidemija uzrokovana NDM pozitivnim sojem *E. cloacae* registrovana je u Istanbulu 2014. godine.³⁰²

Iz Bosne i Hercegovine nema zvaničnih podataka o postojanju karbapenemaza kod enterobakterija, ali je jedan izolat vrste *K.pneumoniae*, kod koga je dokazana produkcija NDM-1 enzima registrovan u Hrvatskoj 2009. godine, bio importovan iz Bosne i Hercegovine.²⁰³ NDM-1-enzim kod *K.pneumoniae* iz hemokulture detektovan je u Crnoj Gori, dok su u Srbiji detektovani i izolati koji su proizvele NDM i OXA-48 enzime.²⁶³

U Francuskoj su NDM enzimi kod enterobakterija među najčešće detektovanim karbapenemazama.²⁶³ Španski komitet za praćenje rezistencije iznosi podatak da su bakterije proizvođači KPC i NDM enzima u porastu.²⁷⁹

Grupa istraživača u okviru EARS-Net komiteta za praćenje rezistencije na karbapeneme iznosi podatak da je u Grčkoj 2012. godine prvi put detektovana NDM pozitivna *K.pneumoniae*, registrovana u nekoliko manjih epidemija.³⁴ Ove metalo- β -laktamaze se kod enterobakterija u Italiji najčešće javljaju sporadično i u izolatima pacijenata koji su boravili van zemlje, ali ima i podataka o epidemijama uzrokovanim NDM-1 tipom enzima.³⁰³

Velika Britanija i Francuska su trenutno zemlje sa najvećim brojem detektovanih NDM proizvođača.²⁸⁷ U Velikoj Britaniji beleži se porast broja i širenje NDM pozitivnih izolata

K.pneumoniae još od 2008. godine kad je detektovan prvi slučaj. Osim *K.pneumoniae*, značajno povećanje broja detektovanih NDM pozitivnih izolata izveštava se i kod *E.coli*.²⁶³

Podaci iz ovog istraživanja odnose se na dokazano prisustvo *bla*_{NDM} gena kod ispitivanih enterobakterija. Ovaj gen detektovan je kao jedini od ispitivanih gena za sintezu karbapenemaza kod deset izolata vrste *K.pneumoniae*, kod osam izolata vrste *E. cloacae*, kod dva izolata vrste *C. freundii*, i kod po jednog izolata vrste *E. aerogenes*, *E. coli*, *S. marcescens* i *M. morgani*. Kod sedam izolata *K.pneumoniae*, dva izolata *E. cloacae* i jednog izolata *E.aerogenes* detektovan je zajedno *bla*_{OXA-48} genom. Od ostalih testiranih bakterijskih izolata, u jednom izolatu *K.pneumoniae* *bla*_{NDM} gen detektovan je u kombinaciji sa *bla*_{KPC} genom, a u kombinaciji sa *bla*_{KPC} i *bla*_{OXA-48} genom u jednom izolatu *E. cloacae*.

Klasa D β -laktamaza, nazvana još i oksacilinaze ima 483 enzima.⁹⁹ Karakteristika ovih enzima je da nemaju svi predstavnici karbapenemazu aktivnost, a od onih koji je poseduju, veliki broj slabo hidrolizuje karbapeneme, i ne dovodi do visokog nivoa rezistencije na karbapeneme. Visok nivo rezistencije na karbapeneme kod OXA-48 produktora najčešće je posledica postojanja udruženih mehanizama rezistencije, kao što je nepropustljivost spoljašnje membrane.^{181, 182} Geni koji kodiraju OXA-48 enzime nalaze se na konjugativnim plazmidima, koji ne nose determinante za druge mehanizme rezistencije, ali je zato njihova sposobnost prenosa među različitim bakterijskim vrstama u okviru porodice *Enterobacteriaceae* izuzetno velika, što omogućava horizontalni prenos i širenje gena.^{304, 305}

Jedna od karakteristika enzima ove klase je i da vrlo slabo ili uopšte ne deluju na cefalosporine proširenog spektra, osim nekih izuzetaka kao što je OXA-163.²⁶² Osim OXA-18, aktivnost ovih enzima ne suprimiraju β -laktamaza inhibitori (klavulanska kiselina i tazobaktam). Nedostatak specifičnog inhibitora predstavlja problem za njihovu identifikaciju u rutinskom radu.¹⁸⁵ Oksacilinaze su prvo otkrivene kod *Acinetobacter sp.*, da bi vremenom sve češće bile detektovane kod enterobakterija.¹⁹⁰

Najčešća karbapenemaza grupe D kod enterobakterija je OXA-48 β -laktamaza koja je opisana prvo u Turskoj u izolatima *Klebsiella pneumoniae* 2003. godine.³⁰⁶ Od tada, postoji više istraživanja koja ukazuju na prisustvo ovih enzima na području Turske, i to često kao izazivača bolničkih epidemija.^{307, 186, 187}

Rasprostranjenost OXA-48 enzima kod enterobakterija u Evropi beleži porast broja detektovanih slučajeva 2015. godine u odnosu na period 2011-2013. godine. Osam evropskih

zemalja izveštava o regionalnom i interregionalnom širenju OXA-48 pozitivnih sojeva. U Turskoj je registrovana endemska situacija.²⁶³

Enzimi OXA-48 su široko rasprostranjeni na evropskom kontinentu, a sve češća je njihova pojava u većini mediteranskih zemalja.¹⁹⁰ Sporadični slučajevi, ali i bolničke epidemije izazvane vrstama *K.pneumoniae*, *Escherichia coli* i *E.cloacae* registrovane su i u Nemačkoj,¹⁸⁸ Švajcarskoj³⁰⁸ i Velikoj Britaniji.³⁰⁹

U trećini belgijskih bolnica registrovane su epidemije izazvane CRE, u kojima su najčešće detektovani OXA-48 enzimi. Slična situacija postoji i u Danskoj, gde su pre 2013. godine izvešteni samo pojedinačni slučajevi pojave CRE, najčešće importovani, dok se u periodu 2013.-2015. godine registruju i interregionalno širenje i epidemije izazvane OXA-48 produktorima. U Holandiji su do skoro registrovane samo sporadične bolničke epidemije KPC, OXA-48 i NDM-pozitivnih enterobakterija, dok Dautzenbrg i saradnici 2014. godine iznose podatke o epidemiji enterobakterija produktora OXA-48 enzima sa transferom sojeva između staračkih domova i bolnica.³¹⁰

Norveška i Švedska imaju mali broj svih tipova detektovanih CRE, što se odnosi i na OXA-48 enzime, ograničen na sporadične slučajeve najčešće vezane za putovanja u druge zemlje.²⁹³ Za razliku od njih, treća skandinavska zemlja, Finska, beleži dominaciju OXA-48 karbapenemaza, a oko 70% pacijenata ima u anamnezi boravak u inostranstvu.²⁶⁹ Wrenn sa saradnicima 2013. godine u Irskoj iznosi podatke o pojavi OXA-48 enzima u izolatima enterobakterija.²⁹⁴

Iako u Mađarskoj dominiraju VIM enzimi, do 2014. godine registrovane su i dve lokalne epidemije uzrokovane OXA-48 pozitivnom *K.pneumoniae*, sa izolatima importovanim iz Rumunije i Ukrajine.³¹¹ Rumunski podaci iz 2013. godine govore o detekciji OXA-48 i OXA-181 enzima na ovom području.³⁰⁰ Zujic-Atalić i saradnici u Hrvatskoj beleže porast broja KPC pozitivnih izolata i porast broja OXA-48 pozitivnih enterobakterija.²⁷⁸

Za razliku od epidemioloških karakteristika sporadičnih izolata enterobakterija koje su proizvodile karbapenemaze u Francuskoj do 2009. godine, kada je većina ovih sojeva bila importovana, poslednjih godina registruju se epidemije izazvane autohtonim sojevima OXA-48 pozitivnih enterobakterija. U 2014. godini, osim najčešće detektovanih OXA-48 pozitivnih *K.pneumoniae* i *E. coli*, registruju se i NDM, VIM i KPC pozitivne CRE.^{188, 264} Španski podaci takođe govore u prilog velike zastupljenosti OXA-48 enzima.²⁷⁹

Prisustvo OXA-48 enzima se u Izraelu detektuje sporadično i u manjim epidemijama. Adler i saradnici opisuju epidemiju izazvanu enterobakterijama koje su proizvodile OXA-48 enzim na jednom odeljenju neonatalne intenzivne nege u ovoj zemlji.³¹²

Prisustvo *bla*_{OXA-48} gena u ovom istraživanju dokazano je kao jedini od ispitivanih gena kod 16 izolata *K.pneumoniae*. Kod sedam izolata *K.pneumoniae*, jednog izolata *E. aerogenes* i dva izolata *E. cloacae* dokazano je prisustvo i *bla*_{OXA-48} i *bla*_{NDM} gena. Od ostalih testiranih bakterijskih izolata, kod jednog izolata *E. cloacae* dokazano je prisustvo *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} i *bla*_{KPC} gena.

Enzimi OXA-48 su široko rasprostranjeni na evropskom kontinentu, a osim Turske, kao sekundarni rezervoar pojavljuju se zemlje Severne Afrike.¹⁹⁰ Na Srednjem Istoku, OXA-48 detektovane su u Saudijskoj Arabiji,³¹³ Libanu,^{314, 315} Omanu³¹⁶ i Kuvajtu.³¹⁷

Na severu Afrike detektovane su u Tunisu,³¹⁸ Maroku,³¹⁹ Libiji, Egiptu³²⁰ i Alžiru,³²¹ ali i u Južnoj Africi.³²² Što se tiče američkog kontinenta, samo u SAD zabeležena je sporadična pojava OXA-48 enzima.³²³

Potron i saradnici u svom istraživanju daju potvrdu pretpostavke da postoji klonalna diseminacija OXA-48 enzima. Njihovi podaci ukazuju na postojanje identičnog klona ST395 *K.pneumoniae* koja produkuje OXA-48 enzim u Maroku, Holandiji i Francuskoj.³²⁴

Poslednjih godina detektuju se i novi tipovi OXA enzima kod enterobakterija. U genima koji kodiraju ove nove tipove enzima najčešće se nalaze tačkaste mutacije koje uslovljavaju različite karakteristike enzima. Od ovih enzima treba pomenuti OXA-181, enzim sa sličnim hidrolitičkim profilom, koji je detektovan kod enterobakterija u Indiji,³²⁵ ali i u izolatima od pacijenata iz Francuske, Velike Britanije, Norveške, Rumunije, Kanade, Australije i Šri Lanke koji su boravili u ovoj regiji.²⁶² Enzim OXA-204 je detektovan kod pacijenata povezanih sa Alžirom i Tunisom, takođe sličnog hidrolitičkog profila i sa samo dve supstituisane aminokiseline u odnosu na OXA-48.³²⁶ U Francuskoj je detektovana varijanta OXA-232, kod pacijenta koji je boravio u Indiji.³²⁷ To je enzim koji ima tačkastu mutaciju u odnosu na OXA-181 koji ima slabiju hidrolitičku aktivnost u odnosu na OXA-48, ali se vrlo često nalazi u enterobakterijama zajedno sa NDM enzimima. OXA-163 varijanta OXA-48-like enzima, kod koje je zabeležena supstitucija jedne i delecija četiri aminokiseline, identifikovana je kod *E. cloacae* i *K.pneumoniae* u Argentini,³²⁸ a kasnije i u Egiptu,³²⁹ gde je detektovana i OXA-247 varijanta enzima.³³⁰ U Kliničkom centru Niš, 2015. godine registrovana je mala bolnička epidemija izazvana OXA-48 pozitivnom *K.pneumoniae* rezistentnom na kolistin.³³¹

U ovom istraživanju, kod pedeset dva izolata dokazano je prisustvo gena za produkciju karbapenemaza, i to: 24 *bla*_{NDM}, 16 *bla*_{OXA-48}, 10 *bla*_{NDM/OXA-48}, jedan izolat *bla*_{NDM/OXA-48/KPC} i jedan izolat sa *bla*_{KPC/NDM} genom. Dominacija NDM enzima i OXA-48 enzima uklapa se u pretpostavku da područje Balkana, čiji deo je i regija sa koje potiču izolati koji su testirani,

predstavlja sekundarni rezervoar ovih enzima. Posebno brine pojava enterobakterija koje proizvode dva ili više tipova karbapenemaza. Izolati kod kojih je dokazano prisustvo istovremeno prisustvo *bla_{NDM/OXA-48}*, *bla_{NDM/KPC}* i *bla_{NDM/OXA-48}/KPC* gena činili su 12 od 52 (23,07%) svih testiranih izolata. Proizvodnja dve ili više karbapenemaza može da poveća njihovu hidrolitičku aktivnost i najčešće je uzrok visokih nivoa rezistencije na beta laktame širokog spektra dejstva, uključujući i karbapeneme. Geni koji kodiraju KPC i NDM enzime se vrlo često nalaze na zajedničkom plazmidu sa genima koji kodiraju ESBL enzime, kao i genima rezistencije na fluorohinolone i aminoglikozide.³³² Izolati koji proizvode NDM, OXA-48 i CTX-M-15 enzime registrovani su kao uzročnici bolničkih epidemija.³³³ Poseban značaj ovi izolati imaju zbog otežane fenotipske detekcije. Mnogi autori ukazuju na pojavu lažno negativnih fenotipskih testova koji uključuju boroničnu kiselinu i helatore kod izolata koji proizvode karbapenemaze iz različitih klasa. Tako, izolati kod kojih su dokazani *bla_{NDM}* i *bla_{KPC}* geni mogu biti primenom fenotipskih testova negativni na jednu ili čak i obe karbapenemaze. U cilju poboljšanja testa u metodu je uveden i disk meropenema sa alfa-fenil boroničnom kiselinom (APBA) i EDTA, koji je dao bolje rezultate u odnosu na osnovni test za izolate koji su proizveli samo jedan tip karbapenemaze, dok je dodavanje meropenema sa fenilboroničnom kiselinom (PBA) i DPA kombinacija koja je dala najbolje rezultate kod izolata koji su proizveli dva tipa karbapenemaza.^{334, 335}

I u ovom istraživanju zabeleženi su problemi u fenotipskoj detekciji sa lažno negativnim rezultatima kod izolata koji su proizveli više različitih enzima. Tako je moguć razlog za negativan rezultat kod KPC pozitivnih izolata činjenica da se kod oba KPC pozitivna izolata radilo o istovremenoj proizvodnji i NDM enzima.

Kontinuirana detekcija rezistencije na karbapeneme i pojava proizvođača karbapenemaza kod velikog broja vrsta koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* (*K.pneumoniae*, *E.cloacae*, *C.freundii*, *E.aerogenes*, *E.coli*, *S.marcescens* i *M.morganii*) detektovanih u izolatima dobijenim od hospitalizovanih pacijenata, ukazuju na veliku opasnost od dalje diseminacije ovih sojeva, posebno u bolničkim sredinama.

Globalna rasprostranjenost enterobakterija koje proizvode karbapenemaze uslovljava potrebu brzog i efikasnog metoda za njihovu detekciju u rutinskom laboratorijskom radu. Otkrivanje i praćenje učestalosti ovih sojeva u bolničkim sredinama neophodno je zbog kontrole bolničkih infekcija ali i individualnih terapijskih mogućnosti kod infekcija izazvanih karbapenemaza pozitivnim sojevima. Pojava CRE nameće potrebu testiranja svih izolata

enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na jedan ili više karbapenema efikasnim metodama dostupnim u rutinskom radu.

Rano otkrivanje karbapenemaza kod enterobakterija posebno je značajno kod izolata osetljivih na karbapeneme. Mnoge studije iznose podatke o tome da bakterije koje poseduju gene za produkciju karbapenemaza mogu biti intermedijarno osetljive, pa čak i senzitivne na određene karbapeneme. Peleg i saradnici izveštavaju o preko 30% MBL pozitivnih izolata, najčešće kod bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*, koje su bile intermedijarno osetljive ili osetljive na imipenem (MIK $\leq 4\mu\text{g/ml}$).³³⁶ Yan i saradnici izveštavaju o epidemiji *K.pneumoniae* koja je posedovala *bla*_{IMP-8} i nalaze da je 88% (35 od 40) izolata bilo osetljivo na karbapeneme.³³⁷ U Grčkoj su opisani klinički izolati *bla*_{VIM-1} pozitivne *E.coli* koja nije bila rezistentna na karbapeneme. Slične podatke nalazimo i u drugim istraživanjima.^{338, 339} Izolati sa niskim nivoom rezistencije na karbapeneme najčešće se u rutinskom radu ne podvrgavaju dodatnim testovima za detekciju karbapenemaza, pa ostaju neprepoznati. Takođe, fenotipski testovi koji se najčešće koriste u rutinskom radu često daju lažno negativne rezultate, što dodatno utiče na nemogućnost detekcije. Rezultat iznetih problema u detekciji ovakvih izolata je neregistrovana diseminacija sojeva koji produkuju karbapenemaze u bolničkim sredinama, ali i mogućnost interhospitalnog širenja.

Kod pacijenata inficiranih bakterijama kod kojih geni koji služe za produkciju karbapenemaza nisu eksprimirani ili je nivo produkcije enzima a time i nivo rezistencije na karbapeneme nizak, klinički ishod terapije karbapenemima je neizvestan. Od strane mnogih autora izveštavaju se loši terapijski rezultati kod infekcija neprepoznatim produktorima karbapenemaza (smrtni ishod, perzistentna infekcija i relapsi), kakvi se viđaju kod upotrebe cefalosporina proširenog spektra u terapiji infekcija izazvanih ESBL pozitivnim sojevima.³⁴⁰

Navedeni razlozi uslovljavaju neophodnost detekcije karbapenemaza ne samo kod rezistentnih, već i kod sojeva koji pokazuju nizak nivo osetljivosti na karbapeneme.

Poseban problem predstavljaju sojevi sa smanjenom osetljivosti na karbapeneme koja je uslovljena hiperprodukcijom AmpC enzima i ESBL u kombinaciji sa porinskim mutacijama. Mogućnost horizontalne transmisije gena za ove mehanizme rezistencije u bakterijskoj populaciji mnogo je manja od mogućnosti transmisije gena koji kodiraju karbapenemaze, pa je i njihov epidemiološki značaj manji. Detekcija vrste mehanizama rezistencije na karbapeneme u rutinskom radu, bez korišćenja molekularnih metoda, često ne može da ih diferencira jer sojevi

hiperproduktori AmpC enzima i ESBL u kombinaciji sa porinskim mutacijama vrlo često dovode do pojave lažno pozitivnih rezultata u fenotipskim testovima za detekciju karbapenemaza.²²⁷

U ovom istraživanju, kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima detektovano je 20 ESBL pozitivnih izolata, šest kod NDM pozitivnih i 14 kod OXA-48 pozitivnih izolata. Kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više tipova enzima detektovan je samo jedan ESBL pozitivan izolat, *Klebsiella pneumoniae* OXA-48/NDM pozitivan. Kod karbapenemaza negativnih bakterija detektovana su tri ESBL pozitivna izolata i jedan AmpC pozitivan izolat. Prisustvo AmpC enzima zajedno sa KPC enzimom kod CDT testa može otežati detekciju KPC, pa je u datom slučaju potrebno obratiti pažnju na razliku u zoni inhibicije između diskova meropenema sa kloksacilinom i meropenema sa boroničnom kiselinom da bi se iz razlike u zoni inhibicije između ovih diskova mogao izvesti zaključak o prisustvu KPC enzima u ispitivanom izolatu.

Brza detekcija produkcije karbapenemaza kod enterobakterija je od izuzetne važnosti za prevenciju diseminacije ovakvih sojeva, naročito u bolničkim sredinama.

Za detekciju vrste mehanizama rezistencije na karbapeneme postoji veliki broj testova koji se koriste i u rutinskom radu i u epidemiološkim istraživanjima. U ovom istraživanju, sojevi koji potencijalno proizvode karbapenemaze, kao klinički i epidemiološki najznačajniji, selektovani su na osnovu graničnih vrednosti datih od strane Evropskog komiteta za ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove (engl.- *European Committee on antimicrobial susceptibility testing- EUCAST*), u verziji jednog dokumenta "Detekcija mehanizama rezistencije".²⁴⁸

Za analizu su izdvojeni izolati enterobakterija koji su disk difuzionom metodom pokazali zone inhibicije za ertapenem i meropenem <25mm, i kod kojih je MIK za oba antibiotika bio >0.125µg/ml, a za imipenem izolati kod kojih je zona inhibicije bila <23mm, a MIK >1.0µg/ml. Ovako postavljene granične vrednosti daju široke i sigurne mogućnosti za detekciju karbapenemaza kod enterobakterija. Neke grupe istraživača preporučuju granične vrednosti za potencijalnu produkciju karbapenemaza od 0,5µg/ml za ertapenem ili 1µg/ml za imipenem i meropenem.³⁴¹ Kod ovih graničnih vrednosti treba uzeti u obzir da bi u ispitivanje potencijalne produkcije ovim bila uključena i proteus grupa enterobakterija koja ima urođeno više nivoa rezistencije na karbapeneme (oko 1µg/ml za imipenem i meropenem). Međutim, postavljanje viših vrednosti MIK na karbapeneme kao graničnih, dovelo bi do propusta u detekciji sojeva koji proizvode karbapenemaze ali su u opsegu intermedijarnih ili čak senzitivnih vrednosti. Nепрепозпnavanje ovih sojeva u bolničkim sredinama ima dalekosežne posledice na epidemiološku situaciju. Čest neuspeh

terapijom karbapenemima kod ovakvih sojeva dalje utiče na razvoj rezistencije u smislu povećanja vrednosti MIK na karbapeneme usled stalnog selektivnog pritiska.³⁴²

U tom smislu, iako niske granične vrednosti dovode do uključivanja u dijagnostiku izolata koji su najverovatnije negativni na produkciju karbapenemaza, one maksimalno povećavaju senzitivnost detekcije i posebno su pogodne za epidemiološko praćenje i kontrolu bolničkih infekcija. Porast rezistencije na karbapeneme kod bakterija uzročnika infekcija bolesnika hospitalizovanih u Kliničkom centru Niš i postojanje sojeva koji imaju visoke vrednosti MIK na ovu grupu lekova³⁴³ iziskuju kontinuirano praćenje i detekciju potencijalnih produkora karbapenemaza u rutinskom laboratorijskom radu.

Podaci ovog istraživanja, kao i rezultati drugih autora, ukazuju na to da promena graničnih vrednosti MIK bilo kog od karbapenema može imati i pozitivne i negativne karakteristike: smanjenje graničnih vrednosti MIK za selekciju izolata za imipenem i meropenem dovodi do povećanja senzitivnosti ali smanjuje specifičnost detekcije karbapenemaza. Takođe, distribucija minimalnih inhibitornih koncentracija nemutiranih sojeva varira i može imati vrednosti i nekoliko puta veće od datih graničnih vrednosti.³⁴⁴

Najbolji odnos senzitivnosti i specifičnosti postiže se primenom diska meropenema za skrining produkcije karbapenemaza kod enterobakterija. Disk ertapenema nije dobar izbor u detekciji enzima Ambler klase A koji nisu KPC. Generalno, ima nisku specifičnost u detekciji karbapenemaza kod enterobakterija, dok AmpC/ESBL pozitivni izolati *Enterobacter sp.* pokazuju više vrednosti MIK na ertapenem u odnosu na imipenem i meropenem, pa korišćenje graničnih vrednosti samo ertapenema može i ove sojeve selektovati za dalju analizu potencijalne produkcije karbapenemaza.^{345, 346}

Maurer sa saradnicima u analizi različitih preporučenih *screening* i kliničkih graničnih vrednosti ukazuje na meropenem kao najbolji indikator potencijalne produkcije karbapenemaza po *screening* graničnim vrednostima preporučenim od strane EUCAST-a (senzitivnost 100%, specifičnost 90,7%). Senzitivnost i specifičnost prema kliničkim graničnim vrednostima prema EUCAST-u za ertapenem iznosi 100%, 62,5%, a za meropenem 90,9%, 94,2%, datim redom. Kliničke granične vrednosti CLSI protokola za ertapenem (<22 mm) i meropenem (<23 mm) daju senzitivnost 95,5% za oba antibiotika, dok je specifičnost 78,2% za ertapenem i 93,6% za meropenem. Kliničke granične vrednosti za imipenem u preporukama EUCAST-a imaju najnižu senzitivnost (81,8%), dok je specifičnost 94,9% a po preporukama CLSI (<23 mm) senzitivnost za imipenem je 90,9% a specifičnost 93,9%.³⁴⁷

Podaci iz ovog istraživanja govore u prilog obaveznog testiranja primenom ertapenema i meropenema za selekciju potencijalnih produkora karbapenemaza prema datim EUCAST kriterijumima, jer su kod tri izolata vrste *K.pneumoniae* (dva izolata kod kojih je PCR metodom potvrđeno prisustvo *bla*_{OXA-48} gena i jedan izolat kod koga je dokazano prisustvo *bla*_{OXA-48} i *bla*_{NDM} gena) MIK vrednosti za imipenem bile niže od preporučenih (0,25µg/ml). Ovakvi sojevi ne bi bili otkriveni primenom imipenema kao jedinog parametra za selekciju (lažno negativni). Takođe, bilo je četiri izolata ostalih ispitivanih vrsta iz porodice enterobakterija sa MIK vrednostima za ertapenem većim od preporučenih kod kojih PCR metodom nisu potvrđeni geni za produkciju karbapenemaza (lažno pozitivni). Od ova četiri izolata, kod tri izolata je fenotipskim metodama potvrđeno prisustvo ESBL enzima (po jedan izolat *P.mirabilis*, *S. marcescens* i *E. aerogenes*) i MIK na ertapenem iznosio je 0.5µg/ml, i kod jednog izolata *S. marcescens* fenotipskim metodama potvrđeno je prisustvo AmpC enzima a MIK za ertapenem iznosio je 8µg/ml. U svim slučajevima zabeleženo je strože kategorisanje disk-difuzionom metodom. S obzirom na to da se disk-difuzionu metoda koristi kao prva metoda za selekciju izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme i potencijalnom produkcijom karbapenemaza, sa datim rezultatima rezistencije postoji mogućnost uzimanja u obzir većeg broja izolata za dalje ispitivanje, ali je zato manja mogućnost da potencijalni produktori karbapenemaza ne budu podvrgnuti daljem testiranju.

Ovo istraživanje obuhvatilo je genotipsku detekciju rezistencije na karbapeneme (PCR metodom) i osam različitih fenotipskih testova za detekciju karbapenemaza, i to: Vitek2 AES sistem, modifikovani Hodge-test, fenotipske testove sinergizma, testiranje disk difuzionom metodom diskom aztreonama, kombinovani disk test (CDT) sa DPA, kloksacilinom, boroničnom kiselinom i temocilinom, MIC MBL test, kolorimetrijski Carba NP test i hromogene podloge.

Validnost fenotipskih testova analizirana je i izražena kroz senzitivnost i specifičnost u poređenju sa PCR metodom za detekciju gena rezistencije kao zlatnim standardom. Određena je osetljivost (broj karbapenemaza pozitivnih izolata koji su korektno identifikovani) i specifičnost (broj karbapenemaza negativnih izolata koji su korektno diferencirani) za svaku od upotrebljenih metoda.²⁵⁶ Na osnovu dobijenih vrednosti za senzitivnost, specifičnost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost (PPV i NPV) izdvojene su fenotipske metode koje su najpodesnije i najdostupnije za rutinski rad. Analizom upotrebljenih fenotipskih metoda nađene su velike razlike u senzitivnosti i specifičnosti među njima.

Iako se PCR smatra referentnim testom za detekciju karbapenemaza, mnogo autora izveštava o fenotipskim metodama kao pouzdanim i dostupnim načinima otkrivanja ovih enzima.

Modifikovani Hodge-test (MHT) je jedan od najčešće korišćenih testova za detekciju potencijalne produkcije karbapenemaza. Lee i saradnici publikuju prvu modifikaciju originalnog Hodge testa 2001. godine, za detekciju karbapenemaza kod *Acinetobacter sp.* i *Pseudomonas sp.*³⁴⁸ U početku je to bio zlatni standard za detekciju,³⁴¹ ali sa pojavom MBL i OXA-48 enzima i njihovim sve većim prisustvom kod enterobakterija, kao i pojavom enzima Ambler klase A kod *Proteus spp.* i *Pseudomonas spp.*, njegov značaj za detekciju u rutinskom radu se smanjuje.³⁴⁹ Modifikovani Hodge-test korektno detektuje prisustvo karbapenemaza, ali ne može da diferencira pojedine klase.²⁵¹ Različite rezultate senzitivnosti i specifičnosti možemo naći u studijama sa pojedinim tipovima karbapenemaza kod ispitivanih izolata. Cury i saradnici iznose podatke o 100% NPV, ali se rezultati odnose isključivo na enterobakterije koje produkuju KPC enzime.³⁵⁰ Doyle sa saradnicima daje podatke o 98% senzitivnosti kod produktora KPC enzima i 93% senzitivnosti kod produktora OXA-48 enzima, dok je kod NDM pozitivnih sojeva senzitivnost iznosila samo 12%.²⁵² Baran daje podatke o 90,69% OXA-48 pozitivnih izolata testiranih MHT testom.³⁵¹ Jedan od nedostataka MHT je pojava lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Uzrok pojave lažno pozitivnih rezultata može biti prisustvo mutacije porina udružene sa hiperprodukcijom AmpC/ESBL što umanjuje specifičnost testa. Slične podatke nalazimo i kod drugih autora^{352, 353,}³⁵⁴ koji ističu subjektivnost u očitavanju testa, posebno kod niske incidence karbapenemaza pozitivnih sojeva. Pasteran i saradnici preporučuju dodavanje boronične kiseline 300µg i oksacilina 300µg pored ertapenema što poboljšava prediktivnost MHT.³⁵⁵

Činjenica da veličina inokuluma direktno utiče na pojavu lažno pozitivnih rezultata kod testiranja enterobakterija na prisustvo ESBL enzima prema preporukama CLSI ukazuje na potrebu provere uticaja inokuluma i kod testiranja enterobakterija na prisustvo karbapenemaza MHT testom.³⁵⁶ Neki autori potenciraju značaj veličine zone inhibicije kontrolnog soja *E.coli* kod MHT.³⁵⁷

U ovom istraživanju modifikovani Hodge-test je bio pozitivan kod 45 karbapenemaza pozitivnih izolata. Lažno pozitivnih izolata nije bilo, a test je pokazao sedam lažno negativnih izolata. MHT je pokazao 86,54% senzitivnosti, 100,00 % specifičnosti, dok je PPV bila 100,00 %, a NPV 36,36 %. Analizom modifikovanog Hodge-testa uočeno je da stepen deformacije zone inhibicije pokazuje četiri različite forme, i to: negativan (bez deformacije zone inhibicije), slabo pozitivan (nezatno izražena deformacija zone inhibicije koja zaključak o rezultatu testa čini subjektivnim), jasno izraženu deformaciju zone inhibicije (pozitivan test) i izuzetno izraženu deformaciju zone inhibicije (jako pozitivan test). Kod izolata koji su produkovali samo NDM

enzime MHT je kod 16 od 19 izolata bio je slabo pozitivan (+/-), a kod samo tri izolata bio je pozitivan (+). Takođe, svih sedam lažno negativnih izolata pripadalo je izolatima koji su proizveli NDM enzime. Kod 10 izolata koji su proizveli NDM sa još jednim enzimom i jednog izolata sa NDM i još dva enzima, pokazao je slabu pozitivnost (+/-) kod osam izolata, dok je jedan izolat bio pozitivan (+) a tri jako pozitivna (++)). Od testiranih 24 izolata koji su proizveli samo NDM enzim, ukupno je bilo 70,83% pozitivno MHT testom. Nasuprot njima, 16 izolata koji su proizveli samo OXA-48 enzime pokazali su bolje rezultate MHT- kod 11 od 16 testiranih izolata pozitivnost (+), i kod četiri od 16 izolata jako pozitivan MHT test (++)-ukupno je bilo 93,75% pozitivno MHT testom. Ovaj test je kod 11 izolata koji su proizveli više od jednog enzima (jedan izolat koji je proizveo KPC, OXA-48 i NDM enzime i deset izolata koji su proizveli NDM i OXA-48 enzime) pokazao slabu pozitivnost (+/-) kod sedam izolata, dok je jedan izolat bio pozitivan (+) a tri jako pozitivna (++)). Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da je MHT test bio najmanje pouzdan kod NDM pozitivnih izolata, bilo da se radi o izolatima od kojih je dokazan samo *bla_{NDM}* gen, ili u izolatima sa prisustvom i drugih gena (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*).

Slične rezultate senzitivnosti i specifičnosti u studiji gde je testiran 101 proizvođač karbapenemaza izveštavaju Bartolini i saradnici.³⁴⁴ U tom istraživanju senzitivnost je iznosila 94% a specifičnost 100%. Najbolje rezultate MHT je dao kod KPC pozitivnih izolata (87 od 87 izolata, 100% senzitivnost, 100% specifičnost). Senzitivnost je bila niža kod testiranja izolata koji su proizveli VIM i KPC/VIM enzime. Diskretna deformacija zone inhibicije registrovana je i kod izolata *Enterobacter sp.* sa smanjenom propustljivošću spoljašnje membrane i hiperprodukcijom AmpC enzima, i okarakterisana je kao lažno pozitivan rezultat. Podaci vezani za testiranje metalo-β-laktamaza u skladu su sa rezultatima ovog istraživanja. Izolati kod kojih je dokazana produkcija NDM enzima pokazali su diskretnu deformaciju zone inhibicije što je onemogućilo precizno definisanje rezultata testa. Kod izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme kod kojih nije dokazano prisustvo karbapenemaza Bartolini i saradnici nisu registrovali lažno pozitivne rezultate, što potvrđuju i drugi autori.^{344, 252, 352} U ovom istraživanju takođe nije bilo lažno pozitivnog rezultata kod AmpC pozitivnog izolata, a kod jednog od tri ESBL pozitivna izolata dao je sasvim diskretnu deformaciju zone, koja ne bi mogla biti pogrešno protumačena kao pozitivan MHT.

Modifikovani Hodge-test je pogodan za detekciju KPC enzima, ali nije dovoljno pouzdan u detekciji MBL enzima.³⁵⁸ U istraživanju koje je sprovedla Girlich sa saradnicima registrovana je niska senzitivnost MHT kod detekcije izolata kod kojih je dokazana produkcija NDM enzima. Posle

dodavanja cink sulfata u Müller–Hinton agar, senzitivnost je poboljšana, sa 77.4% na 94.0%, ali je još uvek postojao izvestan broj lažno negativnih rezultata.³⁴⁹ Bolje rezultate u detekciji izolata koji produkuju MBL je izvođenje MHT na MacConkey agaru sa diskom ertapenema zbog boljeg oslobađanja enzima iz ćelija.³⁵⁹

Glavni nedostaci ovog testa su vreme (18-24 sata) potrebno od izolacije potencijalnih produktora karbapenemaza do dobijanja rezultata i nemogućnost diferenciranja tipa enzima, kao i pojava lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Ove karakteristike, kao i subjektivnost u tumačenju rezultata čine ga nedovoljno pouzdanim u detekciji produkcije karbapenemaza kod enterobakterija. Rezultati senzitivnosti i specifičnosti za MHT, kao i deskriptivne karakteristike MHT kod izolata koji produkuju NDM enzime u ovom testiranju nalaze se u okvirima dosadašnjih istraživanja, kao i rezultati testiranja MHT za izolate koji produkuju OXA-48 enzime.^{252, 349} Ipak, svoje mesto MHT može naći u regijama sa visokom prevalencom produktora karbapenemaza, posebno u regijama endemskim za OXA-48 i KPC enzime, u laboratorijama koje nemaju potrebnu opremu ili mogućnost za korišćenje pouzdanijih testova. U ovakvim situacijama može se pokazati korisnim načinom za diferenciranje potencijalne produkcije karbapenemaza, posebno u epidemijama u bolničkim sredinama.

Kombinovani disk test (CDT) i fenotipski test sinergizma su najčešće upotrebljavani fenotipski testovi za detekciju karbapenemaza klase A, B i D. Fenotipski test sinergizma je test detekcije sinergije karbapenema sa inhibitorom MBL/KPC enzima (najčešće EDTA ili DPA i boronična kiselina). Deformacija zone inhibicije između diskova predstavlja pozitivan test. Interpretacija ovog testa je ipak subjektivna i rezultati se ne mogu kvantifikovati.³⁴⁴

Kombinovani disk test tumači se na osnovu razlike u zoni inhibicije oko diska karbapenema i diska koji sadrži karbapenem i inhibitor enzima. Povećanje zone inhibicije oko kombinovanog diska karbapenem/inhibitor u odnosu na sam disk karbapenema iznad definisanih graničnih vrednosti označava pozitivan rezultat. Oba testa pokazuju dobru senzitivnost čak i u slučajevima niskog nivoa rezistencije na karbapeneme.³⁵³

Detekcija karbapenemaza fenotipskim testovima sinergizma korišćenjem DPA, EDTA, boronične kiseline, kao i kombinovanim disk testom (CDT) po mnogim autorima daje zadovoljavajuće rezultate uzimajući u obzir njihovu senzitivnost i specifičnost.^{360, 361, 362}

Fenotipska detekcija produktora MBL bazira se na specifičnoj inhibiciji MBL enzima helatornim agensima. Helatori inaktiviraju MBL vezujući se za dvovalentne cinkove jone koji predstavljaju aktivno mesto enzima. Jedan od prvih agenasa korišćen za detekciju je EDTA, ali se

za detekciju MBL koristi i dipikolonična kiselina (DPA),³⁶³ 1,10-fenantrolin,³⁶⁴ 2-merkaptopropionična kiselina i natrijum-merkptoacetična kiselina.³⁶⁵

Kombinovani disk test sa EDTA baziran je na povećanju zone inhibicije kod kombinacije karbapenem/EDTA u odnosu na sam karbapenem.

Yong sa saradnicima, koristeći disk imipenema od 10 μ g sa 750 μ g EDTA (da bi se izbeglo stvaranje prevelike zone inhibicije zbog nespecifičnog inhibitornog dejstva samog reagensa) dobio je rezultate senzitivnosti i specifičnosti testa za detekciju MBL od 100% i 95% kod *Pseudomonas* spp. i 95.7% i 91.0% kod *A. baumannii*, sa graničnom vrednošću razlike u zonama inhibicije ≥ 7 mm.³⁶⁶ U istraživanju koje je sproveo Pitout sa saradnicima 2005. godine, preporučuje se meropenem u kombinaciji sa EDTA kao bolja alternativa imipenemu.³⁶⁷ U preporukama grupe eksperata EUCAST-a i Evropskog udruženja za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (*engl.- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases- ESCMID*) za detekciju karbapenemaza koristi se CDT test sa kombinacijom diskova meropenem od 10 μ g i meropenem/EDTA (0,25M). Razlika u zonama inhibicije ≥ 5 mm označava potencijalnu produkciju MBL.^{366, 248} Dalje modifikacije testa uključile su 3-amino-fenil boroničnu kiselinu (PBA) sa ertapenemom od 10 μ g za detekciju KPC karbapenemaze kod vrste *E. coli* i *K.pneumoniae*.³⁶⁸ Mehanizam inhibicije karbapenemaza klase A boroničnom kiselinom još uvek nije objašnjen u potpunosti^{367, 368}

Kombinovani disk test sa diskovima 10 μ g meropenema i kombinacije meropenema sa EDTA (10 μ L od 0.5M) i PBA (10 μ L od 40mg/mL) Pournaras sa saradnicima 2013. godine uvodi za detekciju enzima klase A i klase B iz izolata rektalnih briseva sa senzitivnošću i specifičnošću od 94,8% i 100%, uzimajući razliku od ≥ 5 mm u zonama inhibicije za meropenem 10 μ g i meropenem/inhibitor kao pozitivan rezultat.³⁶⁹

Za detekciju enzima klase A, B i C (AmpC enzima) i ESBL enzima³⁵² Birgy i saradnici 2012. godine koriste test sa EDTA, PBA, klavulanskom kiselinom i kloksacilinom koristeći 30 izolata enterobakterija kod kojih su molekularnim metodama detektovani navedeni enzimi. Kloksacilin disk uveden je za diferencijaciju A klase enzima od hiperproduktora AmpC enzima. U studiji van Dijka³⁴² i saradnika korišćeni su DPA, PBA i temocillin sa meropenemom 10 μ g za identifikaciju enzima A, B i D klase. Senzitivnost detekcije enzima klase A i B iznosila je 95% i 90%, a specifičnost 99% i 96% datim redom.

Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija kod kojih je PCR metodom dokazan samo *bla*_{NDM} gen u ovom istraživanju je kod 21 od 24 izolata pokazao

pozitivnost testiranjem sa DPA i kod 23 od 24 izolata pozitivnost testom inhibicije diskom imipenem/EDTA. Samo jedan izolat koji je produkovao NDM enzim bio je negativan kod svih upotrebljenih testova. Test sinergizma pokazao je za DPA senzitivnost 75,00% i specifičnost 95,00%, PPV 96,43% i NPV 67,86%, dok je test sinergizma za EDTA pokazao senzitivnost 83,33% i specifičnost 100,00%, PPV 100,00% i NPV 76,92%, što ga čini podесnim za detekciju NDM enzima kod enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme detektovane na našem području, ukoliko one produkujу samo ovaj tip enzima.

Kod svih karbapenemaza pozitivnih izolata bakterija kod kojih je dokazano prisustvo više od јednog gena koji kodirajу karbapenemaze, dokazano je prisustvo *bla_{NDM}* gena. Kod izolata koji su produkovali NDM enzim u kombinaciji sa OXA-48 ili KPC enzimima, u pet od 12 izolata DPA test bio je pozitivan, a EDTA test bio je pozitivan kod svih 12 izolata. U ukupnom broju izolata koji su produkovali NDM enzim (36), EDTA test bio je pozitivan kod 35, a DPA kod 26 izolata. Dobri rezultati testiranja sa DPA i EDTA slažu se sa nalazima drugih autora.^{367, 368}

Dva izolata od 56 ispitanih pokazala su prisustvo KPC enzima- izolat *E.cloacae* koji je produkovao i OXA-48 i NDM enzime i izolat *K.pneumoniae* koji je pored KPC enzima produkovao i NDM enzim. Testom sinergizma sa boroničnom kiselinom zabeležen je slabo pozitivan rezultat kod oba ispitana KPC pozitivna izolata (fenomen sinergizma nije bio јasno izražen). Prema podacima istraživanja vezanih za detekciju KPC enzima u izolatima gde su oni prisutni kao јedina karbapenemaza, alfa-fenil boronična kiselina (APBA) je manje efikasna u poređenju sa PBA, a kao objašnjenje iznosi se podatak da APBA јачe inhibira AmpC enzime od PBA, pa je manje specifičan u odnosu na PBA.³⁶¹ Tsakris i saradnici nalaze da je kod izolata koji produkujу KPC/VIM enzime u najvećem broju slučajeva bio pozitivan samo test sa EDTA, dok je test sa boroničnom kiselinom bio negativan.³⁶²

U ovom istraživanju, veliki broj lažno pozitivnih izolata testom sinergizma sa boroničnom kiselinom, 15 od 16, kod enterobakterija kod kojih je potvrđena produkcija samo OXA-48 enzima, uslovljava njegovu nisku specifičnost (51,58%) i nisku PPV (7,14%). Mogućnost pojave pozitivnosti testa sa boroničnom kiselinom, koja nije inhibitor ovog enzima, najčešće se tumači udruženim prisustvom AmpC enzima. U ovom istraživanju nije rađena potvrda prisustva AmpC enzima genetskim metodama, već fenotipskim. U takvim slučajevima, nije verovatno da boronična kiselina deluje na OXA-48 enzime, već je to posledica udružene produkcije AmpC enzima. Skorašnja studija u kojoj je boronična kiselina korišćena za testiranje OXA-48 pozitivnih izolata, ukazuje na veliki broj pozitivnih testova korišćenjem meropenema sa

600µg APBA (73,33%). Treba, međutim, uzeti u obzir da je kod većine izolata samo fenotipskim metodama upotrebom diska ceftazidima sa 600µg APBA određeno prisustvo plazmidskih AmpC enzima (84,67%), te da su potrebna molekularna istraživanja da bi se odredio značaj boronične kiseline u detekciji OXA-48 enzima.³⁷⁰

Kombinovani disk test KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases (Rosco Diagnostica) je set kombinovanih disk testova (CDT) za detekciju karbapenemaza. To je unapređen test koji za razliku od pređašnjih testova sadrži i disk temocilina za detekciju OXA-48, što omogućava fenotipsku detekciju enzima iz A, B, C i D klase po Ambleru.³⁷¹ Ovaj set testova preporučen je i od strane EUCAST-a za rutinsku dijagnostiku.²⁴⁸ Rezultat se dobija u roku od 24 sata od detektovanja smanjene osetljivosti na karbapeneme Vitek2 sistemom ili MIK test trakom. Zadovoljavajuća detekcija MBL enzima uglavnom se postiže CDT testom sa diskovima imipenem/EDTA i imipenem/DPA.²⁶⁴

Kombinovani disk test sa EDTA kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji su proizveli samo NDM enzim je u ovom istraživanju bio negativan kod samo 2 od 24 izolata (jedan izolat *M. morgani* i jedan izolat *K.pneumoniae*), a pozitivan kod 22 izolata. U studiji Bartolinija i saradnika³⁴⁴ senzitivnost ovog testa bila je 54,5% i specifičnost 100%. Korišćenjem *KPC/Metallo-beta-lactamase and OXA-48 Confirm Kit* kombinovanog disk testa, u ovom istraživanju dobijeni su sledeći podaci: kombinovani disk test sa DPA je bio negativan kod 2 izolata od 24 koji su proizveli samo NDM enzim (jedan izolat *E.cloacae* i jedan izolat *K.pneumoniae*) dok je kod 22 izolata test bio pozitivan. Kombinovani disk test sa DPA kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koji proizvode više različitih tipova enzima bio je pozitivan kod sedam od 12 izolata, a kombinovani disk test sa EDTA je bio pozitivan u šest od 12 izolata. U ukupnom boju izolata koji su proizveli NDM enzim (36), 28 izolata je bilo pozitivno kombinovanim disk testom sa EDTA, a 29 izolata je bilo pozitivno kombinovanim disk testom sa DPA. Najbolje rezultate dao je CDT test sa DPA - specifičnost i PPV-100%. Ovo je u skladu sa nalazima autora koji su detekciju vršili primenom istog testa, prema čijim podacima je senzitivnost iznosila 95%, a specifičnost 99%.³⁴⁴

Testiranje DPA/EDTA korišćenjem CDT testa u našem istraživanju dalo je negativne rezultate kod četiri izolata enterobakterija kod kojih je potvrđena produkcija metalo-β-laktamaza. Od ovih izolata, tri su imala su nizak nivo rezistencije na sva tri karbapenema- jedan izolat vrste *M. morgani* i dva izolata vrste *K.pneumoniae*. Ovaj podatak je u skladu sa drugim istraživanjima,

prema čijim podacima je najveći nedostatak CDT metode nemogućnost detekcije pozitivnih izolata kod kojih postoji nizak nivo rezistencije.^{341, 369, 352}

Kombinovani test boronične kiseline bio je kod producenta samo jednog tipa karbapenemaza pozitivan kod osam izolata enterobakterija kod kojih je dokazano prisustvo OXA-48 enzima i dva izolata koji su proizveli NDM enzim. Ovaj test bio je negativan kod oba izolata koja su proizvela KPC enzim. Treba napomenuti da se kod oba izolata kod kojih su dokazani geni koji kodiraju sintezu KPC enzima radilo o istovremenom prisustvu NDM enzima (jedan izolat) i NDM/OXA 48 enzima (jedan izolat). Kod karbapenemaza negativnih izolata, zajedno sa kloksacilinom test je bio pozitivan kod jednog izolata *S.marcescens*, što je ukazivalo na AmpC produkciju. Veliki broj lažno pozitivnih izolata, posebno kod OXA-48 pozitivnih, 10 od 16, i nemogućnost detekcije stvarno pozitivnih KPC izolata uslovio je nisku specifičnost (77,78%) i nisku PPV i senzitivnost (0%) testa, slično podacima Elsherif-a i saradnika.³⁷⁰

Drugi autori, takođe, preporučuju upotrebu CDT za detekciju karbapenemaza u rutinskom radu. Posebno se naglašava efikasnost u detekciji IMP enzima (IMP-8), kao i značaj testa za potrebe epidemiološkog praćenja.^{372, 373}

Hidroliza karbapenema posredovana AmpC enzimima takođe se može potvrditi CDT meropenem/kloksacilin testom.³⁷⁴

Od ostalih komercijalnih CDT testova, u upotrebi je i MAST-CDS (Mast Group, Merseyside, UK), za detekciju B, A i C klase enzima, sa diskovima meropenema 10 μ g i meropenema u kombinaciji sa DPA(1000 μ), APBA (600 μ g) i kloksacilinom (750 μ g). Prema preporukama proizvođača razlika u zoni inhibicije ≥ 5 mm kod kombinacije meropenem/DPA je pozitivan test na produkciju enzima B klase, razlika u zoni inhibicije ≥ 5 mm kod kombinacije meropenem/APBA produkcija enzima A klase, a ako postoji razlika u zoni inhibicije meropenem/APBA ≥ 5 mm i meropenem/kloksacilin ≥ 5 mm, radi se o AmpC produkciji u kombinaciji sa porinskim alteracijama. Ovaj test takođe je pokazao dobre rezultate senzitivnosti (91%) i specifičnosti (100%)³⁷⁵

Posebno treba naglasiti problem detekcije karbapenemaza kod postojanja multiplih mehanizama rezistencije.³⁴⁴ Detekcija *K.pneumoniae* koja proizvodi VIM/NDM u bolničkim sredinama registrovana je u mnogim zemljama- u Grčkoj,³⁷⁶ Italiji,³⁷⁷ Kini.³⁷⁸ Prisustvo karbapenemaza iz različitih klasa u istom izolatu kompromituje rezultate fenotipskih testova koji

pokazuju dobru efikasnost kod izolata koji proizvode samo jedan enzim. Mali broj studija bavio se problemom fenotipske detekcije multiplih mehanizama rezistencije- pojavom više različitih tipova karbapenemaza ili kombinacije karbapenemaza sa AmpC/ESBL enzimima. Rezultati ukazuju na nemogućnost korektno fenotipske detekcije kod ovakvih izolata. Miriagou sa saradnicima uvodi novu kombinaciju- meropenem sa inhibitorima klase B (DPA) i klase A karbapenemaza (APBA) što poboljšava rezultate testa. Glavni nedostatak ove studije je testiranje samo jedne bakterijske vrste- *K.pneumoniae*.³⁵³

U istraživanju Tsakris-a i saradnika³⁷⁹ ovakav test za fenotipsku detekciju MBL i klase A karbapenemaza diskovima meropenema, meropenema sa PBA, meropenema sa EDTA, i meropenema sa PBA i EDTA primenjen je na više različitih vrsta porodice enterobakterija. Test je pokazao dobre rezultate specifičnosti, ali ne i senzitivnosti - nije detektovao enzime kod jednog izolata koji je proizvodio dva različita enzima. Kod dva ESBL pozitivna i AmpC pozitivna izolata dao je lažno pozitivne rezultate produkcije KPC. Slične rezultate pokazala je studija u kojoj su Giske i saradnici koristeći set diskova koji sadrže meropenem (10µg), meropenem sa APBA (600µg), meropenem sa DPA(1000µg), i meropenem sa kloksacinom (750µg) takođe imali lažno negativne rezultate kod izolata koji su proizveli dva različita tipa enzima.³⁶⁰

Slaba efikasnost sinergističkih testova za fenotipsku identifikaciju korišćenjem samo jednog inhibitora kod sojeva koji poseduju gene rezistencije iz različitih klasa (Ambler klasa A i B) opisana je od strane mnogih autora koji ukazuju na moguće negativne rezultate fenotipskih testova za jednu ili čak obe prisutne karbapenemaze.^{344, 380}

Pojava višestrukih mehanizama rezistencije predstavlja ozbiljan problem, jer se usled nemogućnosti fenotipske detekcije ovakvi sojevi mogu nesmetano širiti u bolničkim sredinama. Protokoli za utvrđivanje osetljivosti na AML i detekciju mehanizama rezistencije, kao što su CLSI i EUCAST, još uvek nemaju definisane preporuke za fenotipsku detekciju mehanizama rezistencije kod višestrukih mehanizama rezistencije istovremeno prisutnih u izolatima Gram-negativnih bacila. U ovakvim slučajevima kao jedina mogućnost ostaju molekularne metode detekcije.

Kombinovani disk test (CDT) test je jednostavan, jeftin i relativno pouzdan test za detekciju potencijalne produkcije karbapenemaza. Nedostaci CDT testa su najmanje 18 sati inkubacije od izolovanja potencijalnog produktora karbapenemaza do dobijanja pozitivnih rezultata, i postojanje lažno negativnih rezultata kod slabe ekspresije gena za produkciju karbapenemaza.

Detekcija enzima klase D (OXA-48) korišćenjem CDT i testa fenotipskog sinergizma je od velikog značaja zbog njegove sve učestalije pojave, ali i specifičnog hidrolitičkog profila.³⁸¹ Značaj

ovih enzima je sve veći jer se često beleže epidemije izazvane OXA-48 pozitivnim sojevima širom sveta.^{382, 383, 307}

Detekcija OXA-48 enzima predstavlja ozbiljan problem jer ne postoje specifični inhibitori kao što je to slučaj kod metalo- β -laktamaza i enzima klase A. Ovi enzimi nisu inhibirani klavulanskom kiselinom, tazobaktamom i sulbaktamom, kao ni cink-helatorima. Utvrđeno je da su izolati koji produkuju OXA-48 enzime rezistentni na temocilin,^{384, 385} pa se pošlo od pretpostavke da bi ovaj AML mogao da posluži kao indikator OXA-48 produkcije.³⁸⁶

Daljim istraživanjima utvrđeno je da visok nivo rezistencije na temocilin (MIK $\geq 64 \mu\text{g/mL}$) i piperacilin-tazobaktam (MIK $\geq 128 \mu\text{g/mL}$), zajedno sa smanjenjem osetljivosti na bar jedan karbapenem ukazuju na moguću produkciju OXA-48 enzima.³⁸⁵

Dijk i saradnici su 2014. godine dobili dobre rezultate u detekciji OXA-48 enzima korišćenjem temocilina uporedo sa diskovima PBA i DPA. Mala zona inhibicije (≤ 11 mm) tumačena je isključivo kod izolata kod kojih nije bilo sinergizma sa DPA i PBA. Izolati rezistentni na temocilin i bez sinergije sa DPA i PBA smatrani su pozitivnim na produkciju OXA-48. Poređenjem sa PCR testom kao referentnim dobijene su visoke vrednosti senzitivnosti (100%) i specifičnosti (100%).³⁴² Za razliku od ove grupe istraživača, Oueslati sa saradnicima 2015. godine nalazi da je CDT test sa temocilinom za OXA-48-like enzime (OXA-48, OXA-162, OXA-181 i OXA-204) pouzdan samo kod izolata sa signifikantnom enzimskom aktivnošću.³⁸⁷

Za detekciju OXA-48 enzima Tsakris i saradnici (2015. godine) koriste temocilin u kombinaciji sa sinergizmom imipenema sa EDTA i EDTA/PBA. Rezistencija na temocilin bez deformacija zone inhibicije prema EDTA/PBA disku tumači se kao pozitivan rezultat (96.3% senzitivna, 97.7% specifična).³³⁴

Testirajući sojeve koji su produkovali dve različite karbapenemaze, Miriagou sa saradnicima sugerise testiranje na produkciju OXA-48 enzima kod svih izolata koji su sa dvostrukom i trostrukom kombinacijom diskova pokazali negativne rezultate.³³⁵ Ranije iznet problem nemogućnosti detekcije višestrukih mehanizama rezistencije kod enterobakterija time ne isključuje mogućnost prisustva enzima klase A i B, ali je sa datim kriterijumima moguće otkrivanje OXA-48 enzima.

Jedno od novijih istraživanja, gde je ispitana osetljivost na temocilin zajedno sa osetljivošću na piperacilin-tazobaktam i molekularnom potvrdom produkcije beta-laktamaza, detektovalo je kod različitih vrsta enterobakterija visoke nivoe rezistencije (temocilin MIK ≥ 128 mg/L) kod 15,6%, od kojih je 82,3% produkovalo karbapenemaze. Ostalih 17,7% nije posedovalo karbapenemaze, već

je rezultat tumačen kao izolovana rezistencija na temocilin, čija priroda nije još uvek utvrđena. Visok nivo rezistencije na temocilin detektovan je kod 90,7% OXA-48 pozitivnih izolata u poređenju sa 15,8% izolata koji nisu produkovali OXA-48 enzim. Ovi podaci ukazuju na to da se rezistencija na temocilin ne može samostalno koristiti kao pouzdan kriterijum za detekciju OXA-48 enzima (PPV 27,6%). Međutim, rezistencija na temocilin kombinovana sa odsustvom imipenem /EDTA sinergizma, povećava PPV na 57,7%, a specifičnost na 96,3%.³⁸⁸ Granične vrednosti koje definišu rezistenciju na temocilin dalo je Britansko udruženje za antimikrobnu terapiju (engl.- British Society for Antimicrobial Therapy-BSAC). Ove vrednosti za disk-difuziju iznose ≤ 11 mm, a vrednosti MİK > 32 $\mu\text{g/ml}$.³⁸⁹

U ovom istraživanju, testom sinergizma od 16 OXA-48 pozitivnih izolata, kod 13 je detektovan slabo izražen fenomen sinergizma sa boroničnom kiselinom i kod jednog izolata fenomen sinergizma sa DPA. Svih 16 izolata bilo je rezistentno na temocilin (bez zone inhibicije) i visoko rezistentno na piperacilin-tazobaktam (≥ 128 $\mu\text{g/ml}$). Jedan izolat *E.cloacae* bio je slabo pozitivan na boroničnu kiselinu i kloksacilin, što ukazuje na potencijalnu produkciju AmpC enzima.

Primenom CDT testa kod izolata koji su produkovali samo OXA-48 enzim od 16 izolata nijedan izolat nije bio pozitivan CDT DPA ni CDT EDTA testom i svi su bili rezistentni na temocilin i piperacilin-tazobaktam. Time je kriterijum rezistencije na temocilin (≤ 11 mm), i piperacilin-tazobaktam (MİK ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$), kombinovan sa odsustvom imipenem/DPA/EDTA sinergizma ispunjen, a test pokazao izuzetno dobre rezultate u detekciji produkcije OXA-48 enzima kod izolata koji su produkovali samo ovaj enzim.

Tumačenje rezultata testa diskom temocilina kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju više različitih tipova enzima, u fenotipskom testu sinergizma bilo je onemogućeno kod više od polovine ispitanih izolata činjenicom da je kod njih prisustvo NDM enzima detektovano postojanjem sinergizma karbapenema sa EDTA ili DPA. Primenom CDT testa kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju više različitih tipova enzima, pet od 12 izolata ispunilo je kriterijume za detekciju produkcije OXA-48 enzima diskom temocilina (odsustvo razlike u zoni inhibicije meropenem/DPA/EDTA i rezistencija na temocilin).

Zbog rezultata koji su problematični za tumačenje, kod produkcije OXA-48 ili AmpC enzima, može biti potrebna potvrda drugim metodama.³⁵³

Baziran na istom principu kao CDT test sa EDTA, koristi se i MIC MBL test. Test traka za detekciju metalo- β -laktamaza- MIC MBL test je fenotipska metoda kojom se uglavnom postiže zadovoljavajuća detekcija MBL enzima.³⁵³

Neki istraživači ukazuju i na mogućnost nespecifičnog uticaja EDTA na rezultate specifičnosti testa. Lažno pozitivne rezultate EDTA može dati zbog baktericidnog efekta koji se vezuje za propustljivost spoljašnje membrane, pre nego inhibicije potencijalne MBL.³⁹⁰ Raniji nedostatak ovog testa je efikasnost samo kod visokih nivoa rezistencije na karbapeneme. Njegova senzitivnost u detekciji karbapenemaza pozitivnih sojeva osetljivih na karbapeneme ($MIC \leq 4 \mu g/ml$) je varijabilna i kreće se od 10% do 86%.³⁹¹ U studiji Notakea i saradnika, produkcija IMP enzima kod 68% enterobakterija nije potvrđena MIC MBL testom, jer je kod 59% rezistencija na imipenem bila niskog nivoa ($\leq 4 \mu g/ml$).³⁹² Ovaj nedostatak je korigovan novijim testovima. Efikasnost testova značajno je povećana dodavanjem cinka u podlogu. Senzitivnost je kod upotrebe MIC MBL traka (bioMérieux, la Balme-les-Grottes, France), iznosila 81,5%, specifičnost 100%.³⁶⁷ Bartolini i saradnici korišćenjem MIC MBL testa dobijaju 54,5% senzitivnosti i 100% specifičnosti.³⁴⁴

Generalno, test je u većini istraživanja korišćen za detekciju MBL kod *K.pneumoniae* i *E. coli*, a malo je podataka za ostale vrste enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme.

Rezultati ovog istraživanja slažu se sa rezultatima drugih istraživača. Test traka za detekciju metalo- β -laktamaza- MBL MIC test je bio pozitivan u 18 od 19 izolata koji su produkovali samo NDM enzim. Negativan rezultat zabeležen je samo kod jednog izolata *M. morgani* gde je MIK na sve testirane karbapeneme bio nizak. Od dvanaest izolata kod kojih je registrovano prisustvo više enzima, kod jednog izolata *K.pneumoniae* kod koga je nivo rezistencije na sve testirane karbapeneme bio nizak, zabeležen je negativan rezultat, ali je i kod još pet izolata rezultat testa bio negativan iako su izolati imali vrlo visok MIK na sve testirane karbapeneme. Od 16 izolata koji su produkovali samo OXA-48 enzime jedan je bio lažno pozitivan upotrebom ovog testa. Test MBL MIC nije dao lažno pozitivne rezultate kod četiri izolata kod kojih nije dokazana produkcija karbapenemaza. Senzitivnost testa iznosila je 78,38% a specifičnost 94,74%.

Detekcija karbapenemaza pomoću hromogenih podloga za selekciju karbapenem rezistentnih izolata preporučuje se kao test za *screening* na fekalno (gastrointestinalno) nosilaštvo CRE, koje je najvažniji potencijalni izvor ovakvih sojeva u hospitalnoj sredini.

Svi visoko rizični pacijenti (u jedinicama intenzivne nege, transplantirani, imunokompromitovani i pacijenti koji su boravili u zemljama sa visokom prevalencom CRE) trebalo bi da budu testirani na fekalno nosilaštvo. Kao uzorak koristi se stolica i/ili rektalni bris. Do

dobijanja negativnog rezultata svi pacijenti trebalo bi da budu u striktnoj izolaciji (najmanje 24-48 sati).¹²⁴

Nekoliko komercijalnih testova koji se trenutno koriste analizirano je sa genetski definisanim sojevima- produktorima karbapenemaza (CHROMagar KPC, ChromIDCARBA, SUPERCARBA, Brilliance CRE, The ChromID OXA-48).

Hromogene podloge su u početku korišćene za detekciju ESBL pozitivnih sojeva, da bi kasnije bile dizajnirane i hromogene podloge za detekciju CRE. Hromogeni agar za detekciju CRE je medijum koji sadrži hranljivu bazu i više različitih hromogenih supstrata na koje deluju species-specifični enzimi pa promena boje odgovarajućeg supstrata omogućava detekciju karbapenemaza kod različitih vrsta Gram-negativnih bakterija. Studija Nordmana i saradnika daje podatke da je hromogena podloga dizajnirana za detekciju ESBL enzima (ChromID ESBL; bioMerieux, La-Balme-Les-Grotte, France) dala bolje rezultate senzitivnosti (>95%) za klasu A i B karbapenemaza od podloge predviđene za KPC detekciju (CHROMagar KPC; CHROMagar, Paris, France).³⁴¹ U studiji Gazina i saradnika dobijena je senzitivnost od 87,7% za ChromID ESBL u poređenju sa 40,3% za CHROMagar KPC. ChromID ESBL medijum nepodesan je za detekciju klase D (uključujući i OXA-48 enzime), jer je u njega inkorporiran cefpodoksim, cefalosporin koji hidrolizuju samo enzimi klase A i B, ali ne i oksacilinaze, pa je njihova detekcija na ChromID ESBL podlozi moguća samo u slučaju istovremene produkcije ESBL i enzima klase D.³⁹³ Hromogeni agar Brilliance™ CRE (BC) je podloga sa inkorporiranim karbapenemom i dva hromogena supstrata. Podaci studije iz Pakistana u kojoj je najveći broj testiranih izolata produkovao NDM enzime ukazuju na nisku specifičnost (62,5%), zbog velikog broja lažno pozitivnih izolata koji su bili hiperproduktori ESBL/AmpC. U istoj studiji, ChromIDCARBA agar pokazao je 100% senzitivnosti i specifičnosti, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost od 98% i 91%, uključujući i adekvatnu prebojenost kolonija.³⁹⁴

Adler sa saradnicima³⁹⁵ komparira tri komercijalne hromogene podloge za detekciju CRE iz rektalnih briseva- CHROMagar-KPC (Hy-Labs, Rehovot, Israel), MacConkey agar sa dodatim imipenemom u koncentraciji 1µg/mL, i MacConkey agar sa diskovima imipenema, meropenema i ertapenema. Najviša senzitivnost (85%) i specifičnost (94.3%) je određena kod MacConkey agara sa imipenemom. Ograničenje studije je da su korišćeni samo sojevi koji su produkovali KPC enzime.

Vrioni i saradnici daju podatke o visokoj senzitivnosti (92.4%) i specifičnosti (96.9%) ChromID CARBA agara (bioMerieux), kojim su testirana 92 izolata CPE kod kojih je genotipskim metodama potvrđeno prisustvo gena za sintezu karbapenemaza.³⁹⁶

Jedan od novijih medijuma je SUPERCARBA, nehromogeni medijum razvijen 2012. godine, baziran na Drigalski agaru u koji je inkorporirana niska koncentracija ertapenema sa cink sulfatom i kloksacilinom, za inhibiciju AmpC enzima i izolata kod kojih smanjena osetljivost na karbapeneme nije uslovljena produkcijom karbapenemaza. Ovo je jedini hromogeni medijum koji omogućava detekciju svih klasa karbapenemaza, i jedini medijum koji diferencira produktore karbapenemaza od izolata kod kojih rezistencija na karbapeneme nije uzrokovana ovim enzimima. Detekcija SUPERCARBA medijumom pokazala je najbolje rezultate senzitivnosti i specifičnosti (95,6% i 82,2%) u uporednom testiranju ChromID ESBL agarom i CHROMagar KPC agarom. Omogućava detekciju A, B i D klase karbapenemaza sa senzitivnošću od 100% (klasa A po Ambler-u), 90% (klasa B) i 100% (klasa D).³⁹⁷ Girlich i saradnici su ustanovili da je SUPERCARBA agar pokazao višu senzitivnost (96,5%) od Brilliance CRE (76.3%) i CHROMagar KPC (43%)³⁹⁸

Izolati produktori OXA-48 enzima relativno često daju niske nivoe rezistencije na karbapeneme, i obično su osetljivi na cefalosporine, pa hromogene podloge nisu odgovarajući testovi za njihovu detekciju. Ruppe sa saradnicima preporučuje modifikaciju testa sa prethodnom 24-satnom inkubacijom u bujonu sa ertapenemom, i zatim zasejavanje na Drigalski agar sa MIK testovima za ertapenem i meropenem.³⁹⁹ Senzitivnost i specifičnost testova varira u istraživanjima, što je najčešće posledica karakteristika kolekcija sojeva koji su korišćeni. Prema podacima iz ovog istraživanja, nasuprot podacima drugih autora da hromogene podloge ne daju dobre rezultate u testiranju izolata koji produkuju OXA-48 enzime, testiranjem ChromID CARBA agarom dobijena je visoka senzitivnost i specifičnost za sve testirane sojeve, uključujući i sve OXA-48 pozitivne sojeve osim jednog, gde je MIK meropenema bio 0,25µg/ml, i MIK ertapenema 8µg/ml. Razlog tome mogle bi biti geografske karakteristike sojeva. Karakteristike OXA-48 pozitivnih izolata iz ovog istraživanja pokazale su, za razliku od podataka drugih autora, u 11 od 27 izolata intermedijarnu osetljivost na imipenem (2µg/ml) i visoke nivoe rezistencije na ertapenem (>8µg/ml) i meropenem (>16µg/ml). Kod ove grupe izolata tri su produkovala i OXA-48 i NDM enzime, a 8 izolata samo OXA-48 enzim. U 13 od 27 izolata nivoi rezistencije bili su visoki na sva tri testirana karbapenema, od kojih je sedam produkovalo OXA-48 i NDM enzime, a šest izolata samo OXA-48 enzim. Kod velikog broja izolata (15 od 27) fenotipskim metodama je potvrđena

produkcija ESBL enzima. Takođe, karakteristično je da su svi OXA-48 pozitivni izolati imali visoke nivoe rezistencije na piperacilin-tazobaktam, cefotaksim, cefepim i ceftazidim. Zbog razlika u fenotipskim osobinama i antimikrobnoj osetljivosti sojeva produktora određenog tipa karbapenemaza u različitim regijama, procena validnosti hromogenih podloga mogla bi da se bazira na lokalnoj epidemiološkoj situaciji i karakteristikama sojeva na određenom geografskom području.

U ovom istraživanju, od pedeset dva izolata vrsta iz porodice *Enterobacteriaceae* koji su produkovali NDM, KPC i OXA-48 enzime, testiranjem ChromID CARBA agarom dobijena je senzitivnost od 97,08% i specifičnost od 75%. Izolati su pokazali tipičan porast prema uputstvu proizvođača: vrsta *E. coli* dala je tamnocrvene kolonije a rodovi *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Citrobacter* plavo-zelene do plavo-sivo prebojene kolonije. Izolat vrste *M. morganii* dao je braonkasto prebojene kolonije sa oskudnim porastom. Od karbapenemaza negativnih izolata, *P.mirabilis* je dao vrlo oskudan porast bez kolonija sa braon haloom, dok nije bilo porasta kod ostalih karbapenemaza negativnih kolonija. Prema uputstvu proizvođača, mogućnost detekcije karbapenemaza produktora u proteus grupi ovom podlogom još uvek nije utvrđena. Kod četiri izolata enterobakterija kod kojih nije dokazana produkcija karbapenemaza nije bilo porasta na hromogenom agaru.

Veliki broj komercijalnih testova za kolorimetrijsku detekciju karbapenemaza kod enterobakterija dostupan je za rutinsku upotrebu⁴⁰⁰ (RAPIDEC CARBA NP, Rapid CARB Screen Kit, Carba NP i Carba NP II). Njihova upotreba je jednostavna, omogućava testiranje pojedinačnih izolata i rezultati su dostupni za dva sata od izolacije bakterijske kulture. Test ne zahteva posebnu opremu ni obučenosost osoblja. Pouzdanost testa iskazana kroz senzitivnost i specifičnost potvrđena je od strane mnogih autora. Dörtet sa saradnicima⁴⁰¹ u studiji sa 862 izolata enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme, iznosi podatke o 100% senzitivnosti i specifičnosti, PPV i NPV za ovaj test. Carba NP test u istraživanjima različitih autora daje senzitivnost od 72,5%- 100%, zavisno od modifikacija originalnog protokola^{347, 402, 403} dok su Hombach i saradnici⁴⁰⁴ RAPIDEC CARBA NP testom dobili rezultate senzitivnosti 90,2%, specifičnosti 100%, PPV 100%, i NPV 97,6%. Upotrebom većeg inokuluma specifičnost se povećala na 100%. Drugi komercijalni testovi (Rapid CARB Screen Kit) daju rezultate za senzitivnost 73,3 % za enterobakterije i 66,7 % za *P.aeruginosa*, i specifičnost 100% u oba slučaja.⁴⁰⁵

Upotreba Carba NP testa u ovom istraživanju dala je 20 lažno negativnih izolata posle prvog očitavanja (posle 30 minuta). Lažno negativni izolati su u najvećem broju bili zastupljeni kod *K.pneumoniae* OXA-48 i OXA-48/NDM pozitivnih (15). Posle drugog očitavanja (120 minuta), test je bio pozitivan kod 47 karbapenemaza pozitivnih, lažno negativan kod pet izolata i nije bilo lažno pozitivnih rezultata. Tri lažno negativna izolata posle prvog očitavanja (posle 30 minuta) koji su naknadno pokazali pozitivnost (posle 120 minuta) bili su NDM pozitivni izolati *K.pneumoniae*, deset izolata *K.pneumoniae* OXA-48/NDM (mukoidni sojevi), po jedan izolat *K.pneumoniae* OXA 48/NDM i *K.pneumoniae* NDM koji su imali MIK ertapenema/ meropenema/ imipenema 4/0,25/1µg/ml i NDM 8/0,25/1µg/ml (datim redom). Rezultati ovog istraživanja (senzitivnost 90,38%, specifičnosti 100%, PPV 100%, i NPV 44,44%) ukazuju na dobre karakteristike testa.

Ovi rezultati slažu se sa nalazima drugih autora, gde se pozitivnost u testu za 70% lažno negativnih izolata očitava posle 120 minuta inkubacije.⁴⁰⁴ Dortet i saradnici takođe ukazuju na pojavu lažno negativnih rezultata kod izolata koji produkuju OXA enzime (OXA-244 i OXA-181).⁴⁰⁶ Lažno negativni rezultati kod Carba NP testa zabeleženi su za *Providencia rettgeri*, *P. stuartii* i *P.mirabilis*,^{402, 403} posebno kod mukoidnih sojeva i sojeva kod kojih je utvrđena produkcija NDM enzima.

Potrebna su dalja istraživanja u smislu modifikacije brzih testova kako bi se poboljšala njihova senzitivnost i specifičnost.⁴⁰⁷ Posebno je važno obratiti pažnju na adekvatan inokulum i precizno vreme očitavanja testa. Razlike u senzitivnosti i specifičnosti najverovatnije potiču od vrste izolata, njihovih kulturelnih osobina (mukoidni sojevi), kao i tipa enzima koji poseduju. To se posebno odnosi na područja gde dominiraju OXA enzimi, što se može reći i za naše područje, gde je detektovano prisustvo OXA-48 enzima u velikom broju ispitanih sojeva.

Za određivanje fenotipa rezistencije Vitek 2 AES sistem upoređuje svaku vrednost MIK za dati izolat sa distribucijom MIK vrednosti bakterija sa poznatim mehanizmom rezistencije iz baze podataka. Za određivanje fenotipa rezistencije potrebno je da svi ili svi osim jedne vrednosti MIK odgovaraju MIK distribuciji datog mehanizma rezistencije.

Mnogi autori ispitivali su validnost Vitek2 AES sistema u detekciji fenotipa rezistencije. Woodford sa saradnicima iznosi podatke o 74% senzitivnosti i 38% specifičnosti Vitek2 AES sistema u detekciji karbapenemaza. Posebno ističe problem detekcije OXA-48 enzima koji su, ukoliko nisu udruženi sa ESBL ili AmpC enzimima u najvećem broju slučajeva osetljivi na cefalosporine proširenog spektra dejstva. Takođe, izolati produktori karbapenemaza sa niskim nivoom rezistencije na karbapeneme nisu mogli korektno da budu detektovani ovim sistemom.

⁴⁰⁸U jednoj kineskoj studiji, Vitek2 AES nije dao zadovoljavajuće rezultate u tumačenju produkcije karbapenemaza kod NDM izolata (57 od 100), dok su rezultati bili bolji kod izolata proizvođača KPC enzima (89 od 95).⁴⁰⁹Vadings i saradnici daju podatke o boljim rezultatima Vitek2 AES sistema korišćenjem kartica koje poseduju tri karbapenema, u odnosu na kartice sa jednim ili dva karbapenema.³⁴⁶

Istraživanje sprovedeno na 81 izolatu CRE od kojih je 48 izolata proizvelo karbapenemaze (23 IMP-4, 14 IMP-8, 5 NDM-1, KPC-2), ukazuje na dobru senzitivnost Vitek2 AES sistema u detekciji ovih enzima koja je iznosila 75.00%, dok je specifičnost iznosila 36.4%.⁴¹⁰U tom istraživanju, 85,71% izolata korektno je definisano kao karbapenemaza pozitivni, a slične podatke nalazimo i kod drugih autora- Nakamura i saradnici dobili su poklapanje PCR metode i Vitek2 AES kod 91,6% (120 od 131) izolata.⁴¹¹

Kombinacije karbapenema na određenim Vitek karticama takođe ima uticaja na detekciju fenotipa rezistencije. Sa ertapenemom i meropenemom kao indikatorima ($MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$ i $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, datim redom), Vitek 2 ne može da diferencira karbapenemaza pozitivne izolate od onih sa drugim mehanizmima rezistencije,⁴⁰⁸ posebno ukoliko se ovi kriterijumi primenjuju u oblastima gde postoji veliki broj izolata sa rezistencijom na karbapeneme koja nije posredovana karbapenemazama, kao što su proizvođači ESBL sa alteracijom porina, i koji su rezistentni na ertapenem.

Studija Pasterana i saradnika⁴¹² iznosi podatke da, ukoliko se kao granične vrednosti za *screening* izolata suspektnih na produkciju karbapenemaza uzmu imipenem $MIC \geq 2 \mu\text{g/ml}$ i meropenem $MIC \geq 1 \mu\text{g/ml}$, većina izolata u datom istraživanju bila bi korektno identifikovana. Senzitivnost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost i negativna prediktivna vrednost iznosila je 98%, 94%, 95% i 98% (datim redom). Kod izolata sa alternativnim mehanizmima rezistencije, najčešća distribucija MIK imipenema bila je $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, i MIK meropenema $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$. Prisustvo karbapenemaza određeno AES sistemom je u tom istraživanju detektovano kod 76% izolata. Najbolji rezultati postignuti su u detekciji OXA-163 (100%) i KPC enzima (87%), a u detekciji MBL enzima samo 25% izolata.

Upotrebom Vitek2 AES u ovom istraživanju kod izolata koji su proizveli samo NDM enzime 22 od 24 izolata korektno je definisano kao potencijalni proizvođači karbapenemaza, kao i svih 16 izolata koji su proizveli samo OXA-48 enzime. Produkcija karbapenemaza određena je i kod 10 od 12 izolata koji su proizveli više od jednog enzima. Nije bilo lažno pozitivnih

rezultata. Lažno negativni rezultati zabeleženi su kod jednog NDM pozitivnog izolata *M. morgani* koji je definisan kao ESBL pozitivan, dva NDM pozitivna izolata *E.aerogenes*, definisana kao izolati produktori AmpC enzima sa nepropustljivošću spoljašnje membrane, i jedan OXA-48/NDM pozitivan izolat *E.cloacae* gde je mehanizam rezistencije definisan kao hiperprodukcija cefalosporinaza sa nepropustljivošću spoljašnje membrane. Ukupan broj izolata pozitivnih na produkciju karbapenemaza Vitek2 AES sistemom iznosio je 48 (92,3%). Vitek2 AES sistem pokazao senzitivnost (98,08%) i specifičnost (100,00%) u detekciji karbapenemaza. Rezultati ovog istraživanja slični su podacima studije Valenza-e i saradnika koji su dobili senzitivnost 100,00% i specifičnost 96,00%.⁴¹³ Automatizovani sistemi, kao što je Vitek2 mogu biti korisni u detekciji karbapenemaza, posebno u kombinaciji sa fenotipskim testovima sinergizma. Takođe, efikasnost ove metode zavisi i od vrste soja koji produkuje karbapenemazu, posebno od njegovog profila rezistencije.

Za detekciju karbapenemaza genotipskim metodama kod vrste *P.aeruginosa* u ovom istraživanju izdvojeno je 14 izolata *P.aeruginosa* kod kojih je MIK za imipenem bio $>8\mu\text{g/ml}$. Samo dva izolata bila su osetljiva na piperacilin-tazobaktam i dva izolata bila su osetljiva na cefepim i ceftazidim. Svi izolati bili su rezistentni na imipenem; na meropenem je jedan izolat bio senzitivan i dva intermedijarno osetljiva; ostalih 11 bilo je rezistentno (svi osim jednog izolata imali su $\text{MIK} \geq 16\mu\text{g}$). Svi izolati bili su multirezistentni.

Metodom PCR u ovom istraživanju nije dokazano prisustvo *bla_{VIM}* i *bla_{KPC}* gena ni u jednom ispitanom izolatu. Prisustvo *bla_{NDM}* gena dokazano je kod šest izolata (42,85%). Za fenotipsku detekciju karbapenemaza korišćen je Carba NP test i definisanje fenotipa rezistencije Vitek2 AES sistemom. Fenotipska detekcija produktora MBL je u ispitivana diskovima DPA i EDTA (fenotipski test sinergizma), metodom kombinovanog disk testa (CDT) korišćenjem diskova meropenem/DPA i imipenem/EDTA i MBL MIC testom.

Prema podacima iz ovog istraživanja, kod karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa* u fenotipskom testu sinergizma od šest NDM pozitivnih izolata, DPA test je kod svih izolata bio pozitivan (100%), dok je EDTA bio pozitivan u pet izolata (jedan izolat bio je lažno negativan)-83,3%. Kod osam karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* sedam je bilo lažno pozitivno testom DPA (87,5%), i šest od osam testom EDTA (75%).

Kombinovani disk test (CDT) kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa* je u pet od šest slučajeva dao pozitivan rezultat kod DPA i EDTA (83,3%). Sedam karbapenemaza negativnih izolata bilo je lažno pozitivno na produkciju MBL enzima- pozitivni samo na DPA test (87,5%). Test CDT sa EDTA bio je pozitivan u šest od osam karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* (75%)- lažno pozitivan rezultat. Kod svih karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa* MIC MBL test je dao pozitivne rezultate (100%). Količnik je u svim slučajevima bio >20. Kod sedam od osam karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa* MIC MBL test je dao pozitivne rezultate (87,5%). Količnik je u svim slučajevima bio >20.

Podaci drugih autora ukazuju na dobre rezultate CDT testa sa DPA i EDTA. Peter i saradnici nalaze za CDT sa DPA senzitivnost 84,4% i specifičnost 81,8%, dok je CDT test sa EDTA pokazao senzitivnost 86,7% i specifičnost 51,1%.³⁷³ Khosravi sa saradnicima nalazi da je senzitivnost CDT, testa sinergizma i MIC MBL testa 100%, dok je specifičnost najveća kod testa sinergizma (96,6%) i MIC MBL testa (62,1%), a najniže vrednosti beleže se kod CDT testa (43,1%).⁴¹⁴ U istraživanju Pitout-a i saradnika testom sinergizma IPM+EDTA nađena je senzitivnost 96% i specifičnost 91%, a MIC MBL test takođe je pokazao senzitivnost 96% i specifičnost 91%, gde su ispitivani VIM i IMP produktori.³⁶⁷ I drugi autori iznose slične podatke o senzitivnosti (100%) CDT testa sa EDTA i MIC MBL testa, a najbolje rezultate postižu sa diskom doripenema. Specifičnost CDT testa iznosi 47,2%, a MIC MBL testa 24,64%.⁴¹⁵ Qu sa saradnicima ukazuje na 100% senzitivnosti i specifičnosti upotrebom CDT testa sa EDTA, dok su senzitivnost i specifičnost MIC MBL testa 85,7% i 100%.⁴¹⁶ Počednako senzitivni i specifični su CDT i MIC MBL test kod Behera-e i saradnika, dok je test sinergizma u njihovom istraživanju dao slabije rezultate.⁴¹⁷

Pojava lažno pozitivnih rezultata smanjuje specifičnost testa i umanjuje njegovu vrednost u detekciji karbapenemaza. Lažno pozitivni rezultati koji se beleže kod svih fenotipskih metoda detekcije i u ovom istraživanju ali i kod drugih autora, mogu biti posledica prisustva novih ili metalo- β -laktamaza koje nisu obuhvaćene istraživanjem, dok pojava lažno negativnih rezultata ukazuje na mogućnost nedovoljne ekspresije gena koji kodiraju MBL, što uslovljava slabu aktivnost enzima. Takođe, MIC MBL test nije pogodan za detekciju produktora metalo-beta laktamaza kod izolata koji su senzitivni na karbapeneme, gde bolje rezultate daje CDT test sa EDTA. U ovom istraživanju, potrebna su dalja ispitivanja PCR metodom uvođenjem prajmera za druge tipove MBL.

Od 14 ispitanih izolata, korišćenjem CARBA NP testa zabeležena su dva lažno negativna rezultata i jedan lažno pozitivan rezultat. Rezultati ovog istraživanja slažu se sa rezultatima drugih istraživača. Mnogi autori ističu značaj ovog testa dajući podatke o visokoj senzitivnosti i specifičnosti ovog testa. Peter sa saradnicima daje podatke o 93,3% senzitivnosti i 96,6% specifičnosti.³⁷³ Dortet sa saradnicima nalazi specifičnost od 100%, i senzitivnost 94,4%, sa napomenom da test nije pogodan kod prisustva GES enzima. Autori takođe ističu pozitivnost kod testiranja IMP pozitivnih izolata osetljivih na karbapeneme. Značaj ovog testa posebno se ističe kod detekcije nosilaštva karbapenemaza pozitivnih sojeva, prevencije epidemija u bolničkim sredinama i brzine detekcije (rezultati dostupni za dva sata od izolacije soja). Kako se geni za metalo- beta laktamaze najčešće nalaze na plazmidima, koji omogućavaju njihov prenos i na druge bakterijske vrste (*Enterobacteriaceae* i *Acinetobacter* species), brзом detekcijom sojeva koji produkuju ove enzime sprečava se njihovo širenje u bolničkim sredinama.⁴¹⁸

Ispitivanje fenotipova rezistencije pomoću Vitek2 AES sistema korišćenjem AST N240 kartice pokazalo je različite fenotipove. Produkcija karbapenemaza korišćenjem Vitek2 AES sistema korektno je definisana u četiri od šest izolata kod kojih su PCR metodom dokazani *bla_{NDM}* geni. Dva karbapenemaza pozitivna izolata definisana su kao AmpC+ nepropustljivost spoljne membrane- lažno negativni rezultati.

Kod osam karbapenemaza negativnih izolata, pet izolata je Vitek2 AES sistemom identifikovano kao AmpC+ nepropustljivost spoljne membrane, dok su tri izolata definisana kao nepropustljivost spoljne membrane- nije bilo lažno pozitivnih rezultata. U literaturi nema mnogo podataka o validnosti Vitek2 AES sistema u detekciji fenotipa rezistencije kod *P.aeruginosa*. Neki podaci ukazuju na bolje rezultate u određivanju fenotipa rezistencije kod KPC pozitivnih u odnosu na MBL pozitivne izolate, kao i kod testiranja enterobakterija.^{408, 412}

Kombinovani test boronične kiseline za detekciju enzima klase A kod *P.aeruginosa* u nekim istraživanjima daje dobre rezultate (84,6% korektno identifikovanih izolata).⁴¹⁹U ovom istraživanju *bla_{KPC}* gen nije detektovan ni kod jednog izolata, a ni kod jednog izolata nije zabeležen izolovano pozitivan test samo na boroničnu kiselinu, koji bi ukazivao na prisustvo enzima klase A. Test je bio pozitivan samo kod izolata koji su bili produktori AmpC enzima i pokazali pozitivnost i sa kloksacilinom.

Povećan nivo rezistencije na karbapeneme, a ne samo dokazano prisustvo karbapenemaza u izolatima Gram-negativnih bacila na određenom području obavezuje mikrobiološke laboratorije na

svakodnevni, kontinuirani skrining njihovog prisustva u rutinskom radu sprovođenjem testiranja potencijalnih produkora karbapenemaza fenotipskim metodama. Prvi korak je primena adekvatno odabranih *screening* vrednosti zona inhibicije i MIK vrednosti za selekciju izolata sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme. Time se omogućava prepoznavanje potencijalnih produkora karbapenemaza i njihovo dalje ispitivanje fenotipskim metodama. Ispitivanje mehanizama rezistencije na karbapeneme fenotipskim metodama je dobra alternativa za rutinski rad. Sa aspekta svakodnevnog rada u laboratoriji, upotreba ovih testova je od velikog značaja jer ne zahtevaju skupu opremu i reagense, kao ni specijalnu obuku laboratorijskog osoblja za izvođenje i tumačenje testova. Fenotipske metode su kod izolata sa našeg područja dale relativno dobre rezultate senzitivnosti i specifičnosti. Dobri rezultati senzitivnosti fenotipskih metoda omogućavaju praćenje pojave, porasta broja i distribucije ovih izolata u bolničkim sredinama.

Porast incidence CRE i rezistencije na karbapeneme kod vrste *P.aeruginosa* na našem području i potencijalna opasnost od širenja gena za sintezu karbapenemaza u bakterijskoj populaciji ukazuju na neophodnost dalje analize klinički i epidemiološki značajnih sojeva genotipskim metodama.

Prepoznavanje mehanizama rezistencije i praćenje pojave karbapenemaza pozitivnih izolata od ključnog je značaja za borbu protiv daljeg širenja rezistentnih sojeva, kao i za adekvatan terapijski pristup kod infekcija izazvanih ovim sojevima. Visoka smrtnost i brza diseminacija zahtevaju kompleksan pristup i hitnu primenu mera za kontrolu njihovog prisustva u populaciji, kako u bolničkoj sredini, tako i u vanbolničkim uslovima. Iako protokoli za određivanje antimikrobne osetljivosti ne predviđaju obavezu praćenja ove pojave, mora se uzeti u obzir da se odnose na zemlje u kojima je kontrola bolničkih infekcija regulisana nezavisno od mikrobioloških laboratorija koje se bave rutinskim radom. U našoj zemlji kliničke mikrobiološke laboratorije jedine određuju i prate pojavu i mehanizme rezistencije, te bi stoga njihova obaveza bila da jednu ovako važnu pojavu kontinuirano prate i o tome izveštavaju kliničke lekare, kliničke farmakologe i epidemiologe, kako bi se timskim radom sprečilo dalje širenje bakterijske rezistencije i posledice koje bi ova pojava mogla da ima po ljudsko zdravlje.

7 ZAKLJUČCI

- Primenom fenotipskih metoda je utvrđeno da je najčešći mehanizam rezistencije na karbapeneme kod enterobakterija bila produkcija karbapenemaza iz klase A, B i D po Ambler-u.
- Primenom fenotipskih metoda je utvrđeno da je najčešći mehanizam rezistencije na karbapeneme kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* bila produkcija karbapenemaza. Fenotipske metode ukazale su na prisustvo metalo- β laktamaza (klasa B karbapenemaza po Ambler-u).
- Prisustvo gena za sintezu karbapenemaza kod enterobakterija utvrđeno je kod 92,85% svih ispitivanih izolata. Ovim je odbačena hipoteza da je na našem području rezistencija na karbapeneme posredovana udruženim mehanizmima izmenjene ekspresije porina i hipersekrecijom beta laktamaza proširenog spektra delovanja (ESBL) i AmpC β -laktamaza najčešći mehanizam rezistencije enterobakterija na karbapeneme.
- Kod enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme primenom PCR metode dokazano je prisustvo bla_{NDM}, bla_{OXA-48} i bla_{KPC} gena za produkciju karbapenemaza. Najčešći su bili izolati kod kojih je dokazan bla_{NDM} gen i izolati kod kojih je dokazan bla_{OXA-48} gen, što potvrđuje hipotezu da su NDM i OXA-48 karbapenemaze najčešći tipovi karbapenemaza kod enterobakterija na našem području. Kod 21,42% ispitana izolata enterobakterija detektovano je prisustvo dva ili više različitih tipova karbapenemaza. Kod svih ispitanih izolata dokazano je odsustvo bla_{VIM} gena.
- Kod 42,85% izolata *Pseudomonas aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme PCR metodom je dokazano prisustvo bla_{NDM} gena. Time je potvrđena hipoteza da su za rezistenciju na karbapeneme uslovljenu prisustvom β -laktamaza kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* najčešće odgovorni enzimi iz grupe metalo- β -laktamaza. Kod svih ispitanih izolata *Pseudomonas aeruginosa* dokazano je odsustvo bla_{VIM} i bla_{KPC} gena.

- Fenotipskim metodama dokazano je prisustvo AmpC beta-laktamaza i ESBL kod enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme kod je kojih PCR metodom dokazano odsustvo *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} i *bla*_{KPC} gena.
- Kod enterobakterija, karbapenemaze su najčešće bile detektovane kod *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*. Karbapenemaze su detektovane i kod izolata *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Echerichia coli* i *Morganella morganii*.
- Karakteristike karbapenemaza vezane za vrstu: prisustvo *bla*_{NDM} gena dokazano je najčešće kod vrste *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*, dok je prisustvo *bla*_{OXA-48} gena najčešće dokazano kod vrste *Klebsiella pneumoniae*. Geni za produkciju KPC enzima (*bla*_{KPC}) utvrđeni su kod vrste *Enterobacter cloacae* i vrste *Klebsiella pneumoniae*.
- Detekcija fenotipa rezistencije Vitek2 AES sistemom je kod enterobakterija pokazala visoke vrednosti senzitivnosti i specifičnosti (98,08%, 100%, datim redom), dok je PPV je bila 100%, što ovu fenotipsku metodu čini podesnom za detekciju produkcije karbapenemaza u rutinskom radu.
- Modifikovanim Hodge testom kod enterobakterija dobijene su visoke vrednosti specifičnosti (100,00%), što ukazuje na pouzdanost pozitivnog testa. Najbolje vrednosti zabeležene su kod OXA-48 pozitivnih izolata, dok niske vrednosti NPV (36,36%) ukazuju na veliki broj lažno negativnih izolata, koji su najčešći kod NDM pozitivnih izolata.
- Korišćenjem CARBA NP testa kod enterobakterija dobijene su visoke vrednosti senzitivnosti 90,38% i specifičnosti 100,00%, kao i vrednost PPV koja je bila 96,67%, što opravdava potrebu za njegovom upotrebom, posebno u situacijama kad je potrebna hitna orijentacija o prisustvu karbapenemaza. Niska vrednost NPV 44,44%, ukazuje na značajan broj lažno negativnih rezultata i iziskuje primenu dodatnih testova.
- Fenotipsko ispitivanje produkcije karbapenemaza upotrebom chromID CARBA agar podloge dalo je dobre rezultate senzitivnosti i PPV, što ga čini podesnim za *screening* pacijenata u bolničkoj sredini na fekalno nosilaštvo.
- Od četiri testa koji se koriste u fenotipskoj detekciji karbapenemaza (Vitek 2 AES sistem, MHT, CARBA NP test i chromID CARBA agar) najbolje rezultate po sva četiri parametra

pokazao je Vitek 2 AES sistem. Niske vrednosti NPV kod MHT i CARBA NP testa ukazuju na nemogućnost samostalnog korišćenja u testiranju izolata sa našeg područja.

- Analizom rezultata tri fenotipske metode za detekciju metalo- β laktamaza (kombinovanog disk testa i testa sinergizma za detekciju produkcije MBL dipikoloničnom kiselinom-DPA i etilen-diamino-tetrasirćetnom kiselinom- EDTA i MIC MBL test trake) najbolje rezultate po svim ispitanim parametrima dao je test sa EDTA. Svi testovi pokazali su izuzetno visoku specifičnost (100,00%, 100,00%, 94,74%, datim redom) i PPV, dok je senzitivnost testa nešto manja (75,68%, 83,33%, 78,38%, datim redom). Korišćenjem kombinacije ovih testova u rutinskom radu dodatno bi se smanjio procenat lažno negativnih rezultata, što bi uticalo na povećanje senzitivnosti metode.
- Analizom dve fenotipske metode za detekciju produkcije enzima klase A karbapenemaza, fenotipskog testa sinergizma boroničnom kiselinom i kombinovanog disk testa boroničnom kiselinom, zbog malog broja izolata koji su produkovali KPC enzim iz klase A (dva), i to zajedno sa drugim tipovima karbapenemaza, vrednosti senzitivnosti i NPV koje su bile visoke (nije bilo lažno negativnih izolata) nisu mogle biti adekvatno tumačene. Dobijene su izuzetno niske vrednosti PPV, što ukazuje na veliki broj lažno pozitivnih izolata, posebno kod produktora OXA-48, te je u fenotipskoj detekciji karbapenemaza potrebno istovremeno korišćenje testova za različite klase.
- Metoda fenotipskog CDT testa za detekciju produkcije enzima klase D diskom temocilina pokazala je izuzetno dobre rezultate za sva četiri ispitana parametra, ali samo kod izolata koji su ispunjavali kriterijum nepostojanja sinergizma u testovima vezanim za detekciju MBL/KPC enzima. Karakteristike ispitanih izolata sa našeg područja ukazuju na veliki broj izolata kod kojih je detektovano prisustvo i OXA-48 i NDM enzima, sa pozitivnim fenotipskim testovima za detekciju MBL, čime su oni isključeni iz tumačenja testa diskom temocilina. Time ovaj test, uprkos visokim vrednostima senzitivnosti i specifičnosti, gubi na efikasnosti zbog karakteristika ispitanih izolata.
- Na osnovu dobijenih rezultata senzitivnosti, specifičnosti, PPV i NPV, potvrđena je hipoteza da metode fenotipskog dokazivanja produkcije karbapenemaza predstavljaju pouzdan test za detekciju mehanizma rezistencije koji je posledica enzimske destrukcije karbapenema i kod enterobakterija i kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*.

- Za izolate enterobakterija i *Pseudomonas aeruginosa* sa našeg geografskog područja, *screening* potencijalnih produkora karbapenemaza disk-difuzionom metodom i Vitek 2 AES sistem sa datim graničnim vrednostima MIK i fenotipskim tumačenjem, u kombinaciji sa kombinovanim disk testom-KPC/Metallo-beta-lactamase and OXA-48 Confirm Kit i kombinovanim disk testom imipenem/imipenem+EDTA prema dobijenim rezultatima mogao bi da predstavlja set testova koji bi sa vrlo visokom pouzdanošću selektovao potencijalne produkte karbapenemaza.
- Najčešći fenotipovi rezistencije kod enterobakterija bili su (1) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na kolistin i tigeciklin (17,27%), (2) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na amikacin, tigeciklin, fosfomicin i intermedijarno osetljivi na imipenem (16,36%) i (3) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na kolistin, tigeciklin, fosfomicin i amikacin (14,55%).
- Najčešći fenotipovi rezistencije kod vrste *Pseudomonas aeruginosa* bili su (1) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na piperacilin-tazobaktam i kolistin (28%), (2) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na kolistin (26,67%) (3) izolati rezistentni na sve testirane AML osim na ceftazidim, cefepim, piperacilin-tazobaktam i kolistin (13,33%).
- Svi izolati enterobakterija i vrste *Pseudomonas aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme pokazali su multirezistenciju čime je potvrđena hipoteza da je prisustvo rezistencije na karbapeneme povezano sa rezistencijom na druge klase antimikrobnih lekova, kako kod enterobakterija tako i kod vrste *Pseudomonas aeruginosa*

8 LITERATURA

1. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35: 820–855. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.
2. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35: 790–819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273
3. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35: 912–935. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00294
4. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8: 159–166. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0
5. Patzer JA, Dzierzanowska D, Turner PJ. Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a paediatric intensive care unit in Warsaw: results from the MYSTIC programme (1997–2007). *J Antimicrob Chemother* 2008;62(2):369-375. doi: 10.1093/jac/dkn184. PMID:18445575
6. Marchaim D, Chopra T, Perez F et al. Outcomes and genetic relatedness of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* at Detroit medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32: 861–71. doi: 10.1086/661597.
7. Perez F, Endimiani A, Ray AJ et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *J Antimicrob Chemother* 2010;65: 1807–18. doi: 10.1093/jac/dkq191
8. Wang L, Lansing B, Symons K et al. Infection rate and colonization with antibiotic-resistant organisms in skilled nursing facility residents with indwelling devices. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31(8): 1797–804. doi: 10.1007/s10096-011-1504-7
9. Bergamasco MD, Barroso Barbosa M, de Oliveira Garcia D, et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC)-producing *K.pneumoniae* in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 2012;14: 198–205. 10.1111/j.1399-3062.2011.00688.x.
10. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP et al. Epidemiology and outcomes of health-care associated pneumoniae: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* 2005;128: 3854-3862
11. Lin YT, Chen TL, Siu LK et al. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired thoracic empyema or complicated parapneumonic effusion caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010;29: 1003-1010. doi: 10.1007/s10096-010-0961-8
12. Hu HC, Huang CC, Tsai YH et al. Outcome analysis of patients requiring mechanical ventilation with severe community-acquired pneumonia and identified bacterial pathogens. *Chang Gung Medical Journal* 2005;28(4): 229-236.
13. Borer A, Saidel-Odes L, Reisenberg K. et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30(10): 972–6. doi: 10.1086/605922.
14. Chow JW, Yu VL. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for Gram negative bacteraemia: a commentary. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11(1): 7-12. PMID :10075272
15. Ben-David D, Kordevani R, Keller N et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 2012;18: 54–60. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03478.x
16. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect* 2011;17(8): 1135–41. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03553.
17. Mouloudi E, Protonotariou E, et al. Bloodstream infections caused by metallo-beta-lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K.pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(12): 1250–6. doi: 10.1086/657135.

18. Cheng NC, Chen YY, Chih HT et al. Recent Trend of Necrotizing Fasciitis in Taiwan: Focus on Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* Necrotizing Fasciitis. *Clinical Infectious Disease* 2012;55(7): 930-939. doi:10.1093/cid/cis565
19. Kohler JE, Hutchens MP, Sadow PM et al. *Klebsiella Pneumoniae* necrotizing fasciitis and septic arthritis: An appearance in the western hemisphere. *Surgical Infections* 2007;8(2): 227-232. doi: 10.1089/sur.2006.007
20. Fang CT, Chen YC, Chang SC et al. *Klebsiella pneumoniae* meningitis: timing of antimicrobial therapy and prognosis. *Oxford Journal of Medicine* 2000; 93(1): 45-53. doi: <https://doi.org/10.1093/qjmed/93.1.45>
21. Lin YT, Wang FD, Wu PF et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in diabetic patients: association of glycemic control with the clinical characteristics. *BioMed Central Infectious Diseases* 2013;13: 56-62. 10.1186/1471-2334-13-56
22. Hus KY, Lin MS, Chen W. Pustular skin lesions in a patient with lung abscess. *QJM: Oxford Journal of Medicine* 2011;104(12): 1099-1100. doi:10.1093/qjmed/hcq212
23. Chang CM, Lee HC, Lee NY et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* complicated skin and soft-tissue infections of extremities: emphasis on cirrhotic patients and gas formation. *Infection* 2008;36(4): 328-334. doi:10.1007/s15010-008-7272-3
24. Neuner EA, Yeh J-Y, Hall GS et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69(4): 357–62. 10.3410/f.10652958.11531056
25. Lautenbach E, Han J, Santana E et al. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella species* in long-term care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33(3): 302–4. doi: 10.1086/664055
26. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiol Infect* 2012;18(5): 439–48. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03823.x.
27. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9(4): 228–236. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4.
28. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 2009;33: 405.e1–7. 5. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.09.003
29. Souli M, Kontopidou FV, Papadomichelakis E et al. Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek university hospital. *Clin Infect Dis* 2008;46(6): 847–854. doi:10.1086/528719
30. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis* 2011;52(5):S397–428. doi: 10.1093/cid/cir153
31. Prabaker K, Weinstein RA. Trends in antimicrobial resistance in intensive care units in the United States. *Curr Opin Crit Care* 2011; 17(5):472-9. doi: 10.1097/MCC.0b013e32834a4b03.
32. Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(4):414-26. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.08.020.
33. van Duijn PJ, Dautzenberg MJ, Oostdijk EA et al. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care* 2011; 17(6):658-65. doi: 10.1097/MCC.0b013e32834c9d87.
34. Magiorakos A-P, Suetens C, Monnet DL. The rise of carbapenem resistance in Europe: just the tip of the iceberg. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013;2: 6. doi: 10.1186/2047-2994-2-6PMCID: PMC3691711
35. Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(2): S50-S54. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.014
36. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2016. available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2016/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2016>

37. 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: ECDC; 2017.
38. Paterson DL. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. Clin Infect Dis 2006;43(2): S43–8. doi: 10.1086/504476
39. Hammami S, Boubaker BI, Ghazzi R, Saidani M, Amine S, Redjeb BS. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-beta-lactamase in a kidney transplantation units. Diagn Pathol 2011;6:106. doi: 10.1186/1746-1596-6-106
40. Hurst V, Sutter VL. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital environment. J Infect Dis 1966;116(2): 151-4. PMID: 4956204
41. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406(6799): 959–64. doi:10.1038/35023079
42. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 2002;56: 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
43. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infection in cystic fibrosis. Mol Microbiol 2005;56(2): 309–22. 10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x
44. Sugawara E, Nestorovich EM, Bezrukov SM, Nikaido H. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. J Biol Chem 2006;281(24): 16220-16222. doi: 10.1074/jbc.M600680200
45. Paterson DL, Kim B-N. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mayers DL, Lerner SA, Ouellette M, Sobel JD, Antimicrobial drug resistance. New York: Humana Press; 2009: 811–7.
46. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. Infect Control Hosp Epidemiol 2013;34(1): 1–14. 10.1086/668770 .
47. Marković Đenić Lj. National study on the prevalence of hospital infections. VII National Conference Introduction of the culture of patients safety in the system of health protection of the Republic of Serbia” Belgrade; 2011 October 17; Belgrade: Ministry of Health, Republic of Serbia; Available from: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2011/Oktobar/Oktobar2011NacionalnaStudijaPrevalencijeBolnickihInfekcijaProfdrLjiljanaMarkovicDenic.pdf>
48. Engler K, Mühlemann K, Garzoni C et al. Colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance patterns in COPD patients. Swiss Med Wkly 2012;142: w13509. doi: 10.4414/sm.w.2012.13509.
49. Adediran SG, Dauplaise DJ, Kasten KR et al. Early infection during burn-induced inflammatory response results in increased mortality and p38-mediated neutrophil dysfunction. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010;299(3): R918–25. doi: 10.1152/ajpregu.00132.2010.
50. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996;60(3): 539–74. PMID: 8840786
51. Ranjan KP, Ranjan N, Bansal SK. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. J Lab Physicians 2010;2(2): 74–7. doi: 10.4103/0974-2727.72153; Retraction in: J Lab Physicians 2011;3(2): 129.
52. Yousefi S, Nahaei MR, Farajnia S et al. A multiresistant clone of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 773 spreading in a burn unit in Orumieh, Iran. APMIS 2013;121(2): 146–52. doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02948.x.
53. Smith S, Ganiyu O, John R, Fowora M, Akinsinde K, Odeigah P. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wounds in Lagos, Nigeria. Acta Med Iran 2012;50(6): 433–438.
54. Salimi H, Yakhchali B, Owlia P et al. Molecular epidemiology and drug susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Lab Med 2010;41(9): 540–4. doi: 10.1309/LMNIJE31EDC1WAMP
55. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. 2004;39:309–17.

56. Edgeworth JD, Treacher DF, Eykyn SJ. A 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult intensive care unit. *Crit Care Med* 1999;27(8): 1421–8. PMID: 10470744
57. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(4): 306–13. PMID: 15985826
58. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(1): 43–8. doi: 10.1128/AAC.50.1.43-48.2006
59. Kang CI, Kim SH, Park WB et al. Risk factors for antimicrobial resistance and influence of resistance on mortality in patients with bloodstream infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 2005;11(1): 68–74. doi:10.1089/mdr.2005.11.68.
60. Bergogne-Berezin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs* 1999;58: 51–67. PMID: 10439929
61. Kang CI, Kim SH, Kim HB et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003;37(6): 745–51. doi:10.1086/377200
62. Klibanov OM, Raasch RH, Rublein JC. Single versus combined antibiotic therapy for gram-negative infections. *Ann Pharmacother* 2004;38(2): 332–7. doi: 10.1345/aph.1D132
63. Mladenović-Antić S, Kocić B, Dinić M, Ranđelović G, Stojanović P. Zastupljenost multirezistentnog *P.aeruginosa* i fenotipska detekcija metalo- β -laktamaza kod bolničkih izolata u Kliničkom centru Niš u periodu od 2011.-2014. godine. *Zbornik radova X Kongresa mikrobiologa Srbije-MIKROMED*;2015;184-185
64. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single University Hospital Center in Germany over a 10-year period. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139836. doi: 0.1371/journal.pone.0139836.
65. European Centre for Disease Prevention and Control. EARS-Net Reporting Protocol. July 2015. Stockholm: ECDC; 2015. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2015-EARS-et-reporting-protocol.pdf>
66. De AS, Kumar SH, Baveja SM. Prevalence of metallo- β -betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species* in intensive care areas in a tertiary care hospital. *Indian J Crit Care Med*.2010;14: 217–9. 10.4103/0972-5229.76089
67. Landman D, Bratu S, Kochar S et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(1): 78-82. doi: 10.1093/jac/dkm129
68. Veličković-Radovanović R, Petrovic J, Kocić B et al. Correlation between antibiotic consumption and bacterial resistance as quality indicator of proper use of these drugs in inpatients *Vojnosanit Pregl* 2009;66(4): 307–312. UDC 573.4–021.484.:615.33
69. Kesado T, Hashizume T, Asahi Y. Antibacterial activities of a new stabilized thienamycin, N-formimidoyl thienamycin, in comparison with other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;17(6): 912-7. PMID: 6931548
70. Nord CE, Lindmark A, Persson I. Susceptibility of anaerobic bacteria to meropenem. *J Antimicrob Chemother* 1989;24 A: 113-7. PMID: 2553656
71. Yang Y, Bhachech N, Bush K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995;35(1): 75-84. PMID: 7768785
72. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, et al. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-ormimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)*1984;37(4): 394-400. PMID: 6427167

73. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 1995;36(A): 1–17. PMID: 8543486
74. Balfour JA, Bryson HM, Brogden RN. Imipenem/cilastatin: an update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections. *Drugs* 1996;51(1): 99–136. PMID: 8741235
75. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clin Microbiol Infect* 2000;6(9): 460-3. PMID: 11168179
76. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1979;32(1): 1-12. PMID: 761989
77. Núñez LE, Méndez C, Braña AF et al. The biosynthetic gene cluster for the β -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem Biol* 2003;10(4): 301-11. PMID: 12725858
78. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(5):755-8 PMID: PMC171686
79. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D et al. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(9): 2080-6. PMID: PMC163477
80. Paton R, Miles RS, Hood J et al. ARI-1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993;2(2):81-7. PMID: 18611526
81. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24(1):S19-45. PMID: 8994778
82. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 to bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(4): 1693–1697. doi: 10.1128/AAC.05583-11
83. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(4): 1432–1440. doi: 10.1128/AAC.49.4.1432-1440.2005
84. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (9): 831–838
85. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(2): 306–325. doi: 10.1128/CMR.18.2.306-325.2005
86. Neuwirth C, Siébor E, Duez JM et al. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J Antimicrob Chemother* 1995;36(2): 335-42. PMID: 8522463
87. Villar HE, Danel F, Livermore DM. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. *J Antimicrob Chemother* 1997;40(3): 365-70. PMID: 9338488
88. Bornet C, Chollet R, Malléa M et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301(4):985-90. PMID: 12589810
89. Szabo D, Silveira F, Hujer AM et al. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(8):2833-5. PMID: PMC1538668
90. Chow W, Shlaes DM. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1991;28:499-504.
91. Ghosh AS, Kar AK, Kundu M. Impaired imipenem uptake associated with alterations in outer membrane proteins and lipopolysaccharides in imipenem-resistant *Shigella dysenteriae*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43(2):195-201. doi.org/10.1093/jac/43.2.195
92. Armand-Lêfevre L, Leflon-Guibout V, Bredin J et al. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 β -lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(3):1165-8. doi: 10.1128/AAC.47.3.1165-1168.2003

93. Cao VT, Arlet G, Ericsson BM. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(6):895-900. PMID: 11102406
94. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321-31. PMID: 6109327
95. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211–33. PMID: PMC162717
96. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21(4): 367–71. doi: 10.1097/QCO.0b013e328303670b.
97. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3): 440–58. doi: 10.1128/CMR.00001-07
98. Rasmussen WJ, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(3): 470–82. doi: 10.1093/jac/dkm226
99. ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Lahey.tab
100. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T et al. GES-2 a novel class A beta-lactamase with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(9): 2598–603. PMID: PMC90698
101. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C et al. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(3): 561-5. 10.1093/jac/49.3.561
102. Jeong SH, Bae IK, Kim D. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4809-10. doi:10.1128/AAC.49.11.4809–4810.2005
103. Queenan AM, Shang W, Schreckenber P et al. SME-3 a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 2006;50(10):3485–7. doi: 10.1128/AAC.00363-06
104. Naas T, Livermore DM, Nordmann P. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other beta-lactamase regulators. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:629-37. doi:10.1128/AAC.39.3.629
105. Prottumarthy S, Moland ES, Jeretschko S et al. NMC-A carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9(8):999–1002. doi: 10.3201/eid0908.030096
106. Yu YS, Du XX, Zhou ZH, et al. First isolation of *bla*_{IMI-2} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(4):1610-1611. doi: 10.1128/AAC.50.4.1610-1611.2006
107. Radice M, Power P, Gutkind G et al. First class a carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(3): 1068-9. 10.1128/AAC.48.3.1068-1069.2004 .
108. Aubron C, Poirel LA, Ash RJ et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005;11(2): 260-4. doi: 10.3201/eid1102.030684
109. Yigit H, Quennan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1151–61. 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001
110. Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S et al. Imipenem resistance in *Salmonella* clinical isolate due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(4): 1297–300. PMID: PMC152505
111. Woodford NP, Tierno PM, Young K et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem hydrolyzing class A β -lactamase KPC-3 in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12):4793–4799. doi: 10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004

112. Cuzon G, Naas T, Demachy MC et al. Plasmid-mediated carbapenem -hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(2):796–7. doi:10.1128/AAC.01180-07
113. Currie B. The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Infectious Disease Special Edition* 2012: 9–13.
114. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(8):3026–9. doi: 10.1128/AAC.00299-07
115. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(2):776–8. doi:10.1128/AAC.49.2.776-778.2005
116. Bratu S, Mooty M, Nichani S, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):3018-20. doi:10.1128/AAC.49.7.3018-3020.2005
117. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist* 2013; 1(1):7-16. doi: 10.1016/j.jgar.2013.01.005.
118. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8): 1209–1213. doi: 10.3201/eid1208.060291
119. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(9): 3098–3101. doi: 10.1128/AAC.00438-06.
120. Villegas MV, Lolans K, Correa A et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(8):2880-2. doi:10.1128/AAC.00186-06
121. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:763-5.
122. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase *bla*KPC-2 gene. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1349–56. doi:10.3201/eid1609.091389
123. Bratu S, Landman D, Haag R et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165: 1430-5. doi:10.1001/archinte.165.12.1430
124. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17(10):1791-1798.
125. Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo- β -lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(5):1868-73. doi: 10.1128/AAC.00782-08
126. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1):147–51 PMID: PMC244956
127. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J et al. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(8):2023–7. PMID: PMC90008
128. Riccio ML, Franceschini N, Boschi L et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*IMP allelic variant carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(5): 1229–1235. PMID: PMC89849
129. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzarol A et al. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353(9156):899-900. PMID: 10093989

130. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! Trends in Molecular Medicine 2012; 18(5):263-72. doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003
131. O'Hara K, Haruta S, Sawai T, Tsunoda M, Iyobe S. Novel metallo β -lactamase mediated by a *Shigella flexneri* plasmid. FEMS Microbiol Lett 1998;162:201–6.
132. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K et al. A novel integron like-element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1612–5. PMID: PMC162793
133. Chu YW, Afzal Shah M, Huang E et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* collected in Hong-Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(3):710–4. doi: 10.1128/AAC.45.3.710-714.2001
134. Da Silva GJ, Correia M, Vital C et al. Molecular characterization of bla(IMP-5) a new integron born metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol Lett 2002;215(1):33–9. PMID: 12393197
135. Yano H, Kuga A, Okamoto R et al. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(5):1343–8. doi:10.1128/AAC.45.5.1343-1348.2001
136. Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. Antimicrob Agents Chemother 2002;46(1): 255–258. doi: 10.1128/AAC.46.1.255-258.2002
137. Parkins MD, Pitout JD, Church DL, Conly JM, Laupland KB. Treatment of infections caused by metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region. Clin Microbiol Infect 2007;13: 199–202. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01591.x
138. Koh TH, Wang GC, Sng LH. Clonal spread of IMP-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals in Singapore. J Clin Microbiol 2004;42(11): 5378–5380. doi: 10.1128/JCM.42.11.5378-5380.2004
139. Yan JJ, Ko WCK, Chuang C, Wu JJ. Metallo β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. J Antimicrob Chemother 2002;50(4): 503–11. PMID: 12356794
140. Xiong J, Hynes MF, Ye H et al. *bla*_{IMP-9} and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(1):355–358. doi:10.1128/AAC.50.1.355-358.2006
141. Pagan L, Colinson C, Migliavacca R et al. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase. J Clin Microbiol 2005;43(8):3824–3828. doi: 10.1128/JCM.43.8.3824-3828.2005
142. Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J et al. Integron carrying a novel metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4693–4702. doi:10.1128/AAC.48.12.4693-4702.2004
143. Hanson ND, Hossain A, Buck L et al. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- β -lactamase, IMP-18. Antimicrob Agents Chemother 2006;50(6): 2272–2273. doi:10.1128/AAC.01440-05
144. Pournaras S, Köck R, Mossialos D et al. Detection of a phylogenetically distinct IMP-type metallo- β -lactamase, IMP-35, in a CC235 *Pseudomonas aeruginosa* from the Dutch-German border region (Euregio). J Antimicrob Chemother 2013;68:1271–6.
145. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(7):1584–90. PMID: PMC89328
146. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M et al. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol 2003;41(8):3893–6. doi: 10.1128/JCM.41.8.3893-3896.2003

147. Galani I, Souli M, Chryssouli Z et al. Characterization of a new integron containing *bla*_{VIM-1} and *aac(6')-IIC* in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:634–638. doi:10.1093/jac/dki073
148. Riccio ML, Pallechi L, Fontana R et al. In70 of plasmid *pAX22*, a *bla*_{VIM-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1249–1253. doi:10.1128/AAC.45.4.1249–1253.2001
149. Poirel L, Naas T, Nicolas D et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid and integron borne gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4): 891–897. PMID: PMC89788
150. Jeong SK, Lee K, Chong Y et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo-β-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(2): 397–400. doi:10.1093/jac/dkg047
151. Sardelić S, Pallechi L, Punda-Polić V et al. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-β-lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003;9(8):1022–1023. doi: 10.3201/eid0908.020373
152. Bošnjak Z, Bedenić B, Mazzariol A et al. VIM-2 β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Inf Dis* 2010;42(3): 193–197. doi: 10.3109/00365540903426582.
153. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC et al.. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(8):2224–2228. doi : 10.1128/AAC.45.8.2224-2228.2001
154. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M et al. Novel variant (*bla*_{VIM-4}) of the metallo-β-lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:4026–4028. doi: 10.1128/AAC.46.12.4026-4028.2002
155. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(2):648–650. PMID: PMC321512
156. Libisch B, Gacs M, Csiszar K et al. Isolation of an integron-borne *bla*_{VIM-4} type metallo-β-lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3576–3578. doi:10.1128/AAC.48.9.3576–3578.2004
157. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual *bla*_{VIM-4} gene cassette from hospitalized children in Poland (1998–2001). *J Antimicrob Chemother* 2004;53(3):451–456. doi:10.1093/jac/dkh095
158. Giske CG, Rylander M, Kronvall G. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(9): 3034–3035. doi: 10.1128/AAC.47.9.3034-3035.2003
159. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R et al. Detection of VIM-5 metallo-β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54(1):282–283. doi:10.1093/jac/dkh321
160. Koh TH, Wang GCY, Sng LH. IMP-1 and novel metallo-β-lactamase, VIM-6 in fluorescent *Pseudomonads* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):2334–2336. doi: 10.1128/AAC.48.6.2334-2336.2004
161. Toleman MA, Rolston K, Jones RN et al. *bla*_{VIM-7}, an evolutionary distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1): 329–332. PMID: PMC310168
162. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo-β- -lactamase in Gram-negative bacilli. *Future Microbiol* 2011;6(3):317-333. doi: 10.2217/fmb.11.13.
163. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleki LS et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-β-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(12): 5153–5156. doi: 10.1128/AAC.49.12.5153-5156.2005
164. Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O et al. Characterization of the new metallo-β-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(10):3589–3596. doi: 10.1128/AAC.00465-08

165. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R et al. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2977–2979. doi: 10.1128/AAC.00175-08
166. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENT antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(5):673–679. PMID: 12407123
167. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J. First report of metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):582. doi: 10.1128/AAC.00719-09
168. Lee K, Yum JH, Yong D et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(11):4485–4491. doi: 10.1128/AAC.49.11.4485-4491.2005
169. Yong D, Toleman MA, Giske CG et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12): 5046-5054. doi: 10.1128/AAC.00774-09
170. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(9):597-602. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
171. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis* 2011;17(1):103–106 doi: 10.3201/eid1701.101358
172. Zarfel G, Hoenigl M, Leitner E et al. Emergence of New Delhi metallo- β -lactamase, Austria. *Emerg Infectious Diseases* 2011;17(1):129–130. doi: 10.3201/eid1701.101331
173. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011;11(5): 355–362. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7
174. Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2012;18(3):532-534. doi: 10.3201/eid1803.1103890
175. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA et al. Does broad spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(4): 689–692. doi:10.1093/jac/dkq520
176. Coque TM, Novais A, Carattoli A et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008;14(2):195–200. doi:10.3201/eid1402.070350.
177. Poirel L, Hombrouk-Alet C, Freneaux C et al. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infect Dis* 2010;10(12):832. doi:10.1016/S1473-3099(10)70279-6
178. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N et al. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(6): 2420–2424. doi:10.1128/AAC.01456-09
179. Sekiguchi J¹, Morita K, Kitao T et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(11):4194-7. doi: 10.1128/AAC.01337-07.
180. Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W et al. Tripoli metallo- β -lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter spp.* with decreased resistance to imipenem in Japan *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2477-2478. doi: 10.1128/AAC.01790-13
181. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1): 24–38. doi: 10.1128/AAC.01512-08
182. Rasmussen WJ, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57(3):373–383. doi: 10.1093/jac/dki482

183. Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(1): 11–18. PMID: 12096001
184. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4): 933–951. doi: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
185. Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999;5(11): 865–879. PMID: 10539993
186. Gulmez D, Woodford N, Palepou MF et al. Carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemase and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31: 523–526. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017
187. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I et al. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48 persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008; 54(2):101-106. doi: 10.1159/000118661
188. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E et al. Emergence of OXA-48--type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2125–8. 56(4): 2125–2128. doi: 10.1128/AAC.05315-11
189. Carrère A, Poirel L, Yilmaz M et al. Spread of OXA-48- encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):1369-1373. doi: 10.1128/AAC.01312-09.
190. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(7):1597-1606. doi: 10.1093/jac/dks121.
191. Segal H, Elisha BG. OmpK37 and reduced susceptibility to imipenem and meropenem in *Klebsiella pneumoniae*. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abstract Book. Prag; 2004, abstract 902, p697.
192. Elliot E, Brink AJ, Van Greune J et al. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Infect Dis* 2006; 42 (11): e95-e98. doi :10.1086/503264
193. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P et al. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f β -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39(2):125-7. PMID: 11248526
194. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(11):3035-3039. PMID: PMC101599
195. Woodford N, Zhang J, Warner M et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(6):1261–1264. . doi: 10.1093/jac/dkn396.
196. Babouee B, Widmer AF, Dubuis Q et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3 carrying *Klebsiella pneumoniae*, introduced to Switzerland 2009–10. *Euro Surveill* 2011;16(11):pii=19817
197. Steinmann I, Kaase M, Gatermann S et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain KPC-2 and VIM-1 in a German University hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill*. 2011;16(33):pii=19944.
198. Bogaerts P, Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(2):361–362. 10.1093/jac/dkp453
199. Richter SN, Frasson I, Bergo C et al. Transfer of KPC-2 β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: The first case in Europe. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 2040–2042. doi: 10.1128/JCM.00133-11
200. Nordmann P, Mariotte S, Naas T et al. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase of *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(5):939–946. PMID: PMC187856
201. Li B, Sun JY, Liu QZ et al. First report of *Klebsiella oxytoca* strains coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6): 2937–2941. doi: 10.1128/AAC.01670-10

202. Tsang KY, Luk S, Lo JY et al. Hong-Kong experiences the »Ultimage superbug«: NDM-1 *Enterobacteriaceae*. Hong -Kong Med J 2012. 18(5): 439–441. PMID: 23018074
203. Bedenić B, Mazzariol A, Plečko V et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. J Chemother 2012; 24(4):237-9. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000017.
204. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009; 58(Pt 9):1133-48. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0.
205. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol 2011;2: 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2011.00065
206. Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. Antimicrob Agents Chemother 2013;57(1):396–401. doi: 10.1128/AAC.01784-12
207. Villegas MV, Lolans K, Correa A et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51(4): 1553–1555. doi: 10.1128/AAC.01405-06
208. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis between the novel KPC variant, KPC-5, and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(2):557-562. doi: 10.1128/AAC.00734-08.
209. Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G et al. Identification of bla(IMP-22) in *Pseudomonas spp.* in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. J Antimicrob Chemother 2009;63:901–8. 63 (5): 901-908. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkp061>
210. Jeannot K, Poirel L, Robert-Nicoud M et al. IMP-29, a novel IMP-type metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2012;56(4):2187-2190. doi: 10.1128/AAC.05838-11.
211. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010;36(3):S8–S14. doi: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
212. Jovcic B, Vasiljevic Z, Đukic S Emergence of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a paediatric hospital in Serbia. J Med Microbiol, 2001; 60: 868-869
213. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A et al Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries J Antimicrob Chemother 2014;69(7): 1804-1814. doi: 10.1093/jac/dku048
214. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Expert Opin Investig Drugs 2008;17(2):131-143 10.1517/13543784.17.2.131
215. Shanthi M, Sekar U, Kamalanathan A et al. Detection of New Delhi metallo beta lactamase-1 (NDM-1) carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* in a single centre in southern India. Indian J Med Res 2014; 140(4): 546–550.
216. Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V et al. Emergence of NDM-1 Metallo- β -Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(8): 3929-3931.
217. Golshani Z, Sharifzadeh A. Prevalence of blaOxa10 Type Beta-lactamase Gene in Carbapenemase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Patients in Isfahan. Jundishapur J Microbiol 2013 July; 6(5): e9002. DOI: 10.5812/jjm.9002
218. Koebnik R Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol Microbiol 2000; 37(2):239-253.
219. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol 2008; 6(12):893-903. doi: 10.1038/nrmicro1994.
220. Nikaïdo H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67(4):593-656.
221. Shin SY, Bae IK, Kim J et al. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. J Med Microbiol 2011;61: 239–245. 10.1099/jmm.0.037036-0

222. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp.* clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(4):659-67. doi: 10.1093/jac/dkp029.
223. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 (1): 82–89. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01860.x
224. Bidet P, Burghoffer B, Gautier V et al. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K.pneumoniae* . *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8): 3562–3565. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3562-3565.2005
225. Bradford PA, Urban C, Mariano N et al. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(3): 563–569.
226. Lee K, Yong D, Choi YS, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29(2): 201–206. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.09.006
227. Jacoby GA. AmpC β-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1): 161–182. doi: 10.1128/CMR.00036-08
228. Lartigue MF, Poirel L, Poyartet C et al. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(2): 315–317. doi: 10.3201/eid1302.060747+
229. Garcia-Fernandez A, Miriagou V, Papagiannitsis CC et al. An ertapenem-resistant extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4178-84. doi: 10.1128/AAC.01301-09
230. Hancock REW, Brinkman FS. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:17-38.
231. Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1831-1836.
232. Livermore DM. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:247–250.
233. Pai H, Kim JW, Kim J et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:480–484.
234. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(8):3086-3092.
235. Quinn JP, Dudek EJ, DiVincenzo CA et al. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 1986;154(2):289-294.
236. Livermore DM. Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbenicillin-resistant and susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1984;18(2): 261–270.
237. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34(5): 634–640.
238. Llanes C, Hocquet D, Vogne C et al. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1797–1802.
239. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(12):3322–3327.
240. Saito K, Yoneyama H, Nakae T. nalB-type mutations causing the overexpression of the MexA-MexB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 1999;179: 67–72.
241. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T et al. In vitro emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(2): 287–291.

242. Masuda N, Ohya S. Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9): 1847–1851.
243. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(2): 479–487.
244. Li X-Z, Barré N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(6): 885–893.
245. Kohler T, Epp SF, Curty LK, et al. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1999;181(20): 6300–6305
246. Pechere JC, Kohler T. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 1999;5 (1): S15–S18.
247. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Informational Supplement M100-S25. 2015. CLSI Wayne, PA, USA.
248. The European Committee on antimicrobial susceptibility testing. available from: <http://www.eucast.org/>
249. Kaase M, Szabados F, Lars Wassill L et al. Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a Commercial Multiplex PCR. *J Clin. Microbiol* 2012; 50 (9): 3115-3118, doi:10.1128/JCM.00991-12
250. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR *J Antimicrob Chemother* 2012;67(4):906-909 doi:10.1093/jac/dkr563
251. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae* 2007;45(8):2723-2725
252. Doyle D, Peirano G, Lascols C et al. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012;50(12): 3877–3880.
253. Walsh TR1, Bolmström A, Qwärnström A et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2755-2759.
254. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* *Emerging Infectious Diseases* 2012;18(9):1503-1507 doi:10.3201/eid1809.120355
255. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M et al. Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan;33(1):35-40. doi: 10.1007/s10096-013-1925-6. Epub 2013 Aug
256. Ilstrup DM. Statistical methods in microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(3):219–226.
257. Hidron AI, Edwards JR, Patel J et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29(11): 996–1011.
258. Infectious Diseases Society of America (IDSA), Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(5): S397–S428.
259. Vincent JL, Rello J, Marshall J et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009; 302(21): 2323–2329.
260. Patel G, Huprikar S, Factor SH et al. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29(12): 1099–1106.
261. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P et al. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(2): 654–663.
262. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(9): 821–830.

263. Albiger B, Glasner C, Struelens M. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20(45). pii: 30062. DOI:<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30062>
264. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(9): 785–796.
265. Rodríguez-Zulueta P, Silva-Sánchez J, Barrios H et al. First outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates in a Mexican Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(8): 4086–4088.
266. Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(1): 243–244.
267. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R et al. Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(12): 5493–5499.
268. Tóth Á, Damjanova I, Puskás E et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29(7): 765–769. DOI:10.1007/s10096-010-0921-3
269. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(12):2860–2864. DOI: 10.1093/jac/dks299 PMID: 22855858
270. El Salabi A, Borra PS, Toleman MA et al. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2241–2245.
271. Yong D, Toleman MA, Bell J et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, *bla*_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(12): 6154–6159.
272. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4654–4661.
273. Jakobsen L, Hansen F, Stegger M et al. Use of whole-genome sequencing for detection of the spread of VIM-4-producing *Escherichia coli* between two patients in Denmark. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 45(3):327–329. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.003 PMID: 25595952
274. Pavelkovich A, Balode A, Edquist P et al. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the Baltic countries and St. Petersburg area. *Biomed Res Int.* 2014; 1-7: pii= 548960.
275. Grisold AJ, Hoeningl M, Ovcina I et al. Ventilator-associated pneumonia caused by OXA-48-producing *Escherichia coli* complicated by ciprofloxacin-associated rhabdomyolysis. *J Infect Chemother.* 2013; 19(6):1214–1217.
276. Bogaerts P, de Castro RR, Deplano A et al. Detection of a VIM-27-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a patient following surgical tourism in Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(9): 4488–4489. DOI: 10.1128/AAC.00688-11 PMID: 21746946SIS
277. Markovska R, Schneider I, Stoeva T et al. First identification of KPC-2 and VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 77(3):252–253. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.019 PMID: 24041551
278. Zujic Atalic V, Bedenic B, Kocsis E et al. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Croatia – the results of a multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(11): 894–903. DOI: 10.1111/1469-0691.12635 PMID: 24674100
279. Oteo J, Saez D, Bautista V et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(12):6344–6347. DOI:10.1128/AAC.01513-13 PMID: 24041898
280. Miriagou V, Douzinas EE, Papagiannitsis CC et al. Emergence of *Serratia liquefaciens* and *Klebsiella oxytoca* with metallo- β -lactamase-encoding IncW plasmids: further spread of the *bla*_{VIM-1}-carrying integron In-e541. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32(6):540–541.

281. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4): 2184–2186.
282. Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS ONE* 8(4): e61322.
283. Göttig S, Hamprecht AG, Christ S et al. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(8): 1737–1740.
284. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance; the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance type. *J Med Microbiol*. 2013; 62(Pt4): 499–513.
285. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(5): 381–393.
286. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA et al. Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(10): 2288–2294.
287. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR et al. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*. 2011; 19(12): 588–595.
288. Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L et al. New Delhi metallo- β -lactamase around the world; an eReview using Google Maps. *EuroSurveill*. 2014; 19(20). pii: 20809.
289. Halaby T, Reuland AE, al Naiemi N et al. A case of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5): 2790–2791.
290. Zowawi HW, Balkhy HH, Walsh TR, et al. β -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian peninsula. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(3): 361–380.
291. Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ et al. Emergence of nosocomial New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39(2): 183–184.
292. Jakobsen L, Hammerum AM, Hansen F et al. An ST405 NDM-4-producing *Escherichia coli* isolated from a Danish patient previously hospitalized in Vietnam. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(2): 559–60. DOI: 10.1093/jac/dkt356 PMID: 24746608
293. Löfmark S, Sjöström K, Mäkitalo B et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sweden 2007–2013: Experiences from seven years of systematic surveillance and mandatory reporting. *Drug Resist Updat*. 2015; 20: 29–38. DOI: 10.1016/j.drug.2015.05.001 PMID: 26004211
294. Wrenn C, O'Brien D, Keating D et al. Investigation of the first outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ireland. *J Hosp Infect*. 2014; 87(1): 41–6. DOI: 10.1016/j.jhin.2014.03.001 PMID: 24746608
295. Hrabak J, Papagiannitsis CC, Studentova V et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. *Euro Surveill*. 2013; 18(45). pii: 20626. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.45.20626
296. Studentova V, Dobiasova H, Hedlova D et al. Complete nucleotide sequences of two NDM-1-encoding plasmids from the same sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(2): 1325–8. DOI: 10.1128/AAC.04095-14 PMID: 25421477
297. Pirš M, Andlovic A, Cerar T et al. A case of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a patient transferred to Slovenia from Libya, November 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16(50). pii: 20042.
298. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J et al. NDM-producing *Enterobacteriaceae* in Poland, 2012–14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71(1): 85–91. doi: 10.1093/jac/dkv282.

299. Schreterova E, Takačova V, Nikš M et al. Methods of phenotypic determination of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Slovakia. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2014; 20(3):79-84. PMID: 25702288
300. Szekeley E, Damjanova I, Janvari L et al. First description of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-181} producing *Enterobacteriaceae* strains in Romania. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(8):697-700. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.10.001 PMID: 2418348325830029
301. Poirel L, Savov E, Nazli A et al. Outbreak caused by NDM-1- and RmtB-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4):2472-4. DOI: 10.1128/AAC.02571-13 PMID
302. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A et al. Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(5): 2929–33.
303. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A et al. Outbreak of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in northern Italy, July to August 2011. *Euro Surveill*. 2011; 16(47). pii: 20027. PMID: 22152705
304. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(1): 559–562.
305. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(1): 467–471.
306. Poirel L, Héritier C, Tolün V et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(1): 15–22.
307. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H et al. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(8): 2950–2954.
308. Potron A, Schrenzel J, Poirel L et al. Emergence of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40(6): 563–564.
309. Thomas CP, Moore LS, Elamin N et al. Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42(6): 531–536.
310. Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME, et al. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill*. 2014; 19(9). pii:20723. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20723 PMID: 24626209
311. Jánvári L, Damjanova I, Lázár A et al. Emergence of OXA-162-producing *Klebsiella pneumoniae* in Hungary. *Scand J Infect Dis*. 2014; 46(4):320-4. DOI:10.3109/00365548.2013.879993 PMID: 24552581
312. Adler A, Solter E, Masarwa S et al. Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(9):2926-30. DOI: 10.1128/JCM.01049-13 PMID: 23804390
313. Al-Agamy MH, Shibl AM, Elkhizzi NA et al. Persistence of *Klebsiella pneumoniae* clones with OXA-48 or NDM carbapenemases causing bacteraemias in a Riyadh hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 76(2): 214–216.
314. Matar GM, Dandache I, Carrër A et al. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum beta-lactamase. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010; 104(3): 271–274.
315. Matar GM, Cuzon G, Araj GF et al. Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(9): 887–888.
316. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F et al. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(5): E144–E148.
317. Poirel L, Carbonnelle E, Bernabeu S et al. Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(8): 2051–2052.
318. Cuzon G, Naas T, Lesenne A et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 b-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36(1): 91–93.

319. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT et al. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med. Parasitol* 2010; 104(4): 327–330.
320. Poirel L, Abdelaziz MO, Bernabeu S et al. Occurrence of OXA-48 and VIM-1 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Egypt. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41: 90–91.
321. Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z et al. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(9): 1641–1646.
322. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C et al. 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*. 2013; 51(1): 369–372.
323. Lascols C, Peirano G, Hackel M et al. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 130–136.
324. Potron A, Kalpoe J, Poirel L et al. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(12): E24–E26.
325. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E et al. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(10): 4896–4899.
326. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 633–636.
327. Potron A, Rondinaud E, Poirel L et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 41(4):325–329.
328. Poirel L, Castanheira M, Carrër A et al. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(6): 2546–2551.
329. Abdelaziz MO, Bonura C, Aleo A et al.. OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2489–2491.
330. Gomez S, Pasteran F, Faccone D et al. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19: E233–E235.
331. Mladenović- Antić S, Kocić B, Đilas M et al. Outbreak of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* containing *bla*_{OXA-48} in Clinical center Niš. *Days of preventive medicine, Book of abstracts*, 2015; 8(28).
332. Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene blaKPC-2 carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin- susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52:2962-2965.
333. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat *J Glob Infect Dis*. 2016 Jan-Mar; 8(1): 41–50
334. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P et al. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for the differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(4):1245-51. doi: 10.1128/JCM.03318-14.
335. Miragou V, Tzelepi E, Kotsakis SD et al. 2013. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect*, 19, E412-5.
336. Peleg AY, Franklin C, Bell JM et al. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1549-1556.

337. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH et al. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol. 2001; 39(12):4433-9.
338. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-β-lactamase gene bla_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:824-829.
339. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K et al. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40:349-353.
340. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2001; 39(6):2206-2212.
341. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG et al. Identification and screening of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2012, 18(5):432–438.
342. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(4):345-9. doi: 10.1111/1469-0691.12322.
343. Mladenovic-Antic S, Kocic B, Velickovic-Radovanovic R et al. Correlation between antimicrobial consumption and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting: a 10-year study. J Clin Pharm Ther. 2016; 41(5):532-7. doi: 10.1111/jcpt.12432
344. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A et al. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. Gut Pathogens 2014, 6:13.
345. Willems E, Verhaegen J, Magerman K et al. Towards a phenotypic screening strategy for emerging beta-lactamases in Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents. 2013, 41(2):99–109.
346. Vading M, Samuelsen O, Haldorsen B et al. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infect. 2011, 17:668–674.
347. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C et al. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. J. Clin. Microbiol. 2015; 53(1): 95-104.
348. Lee K, Chong Y, Shin HB et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect. 2001; 7:88–91.
349. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012; 50 (2):477–479.
350. Cury AP, Andreatzi D, Maffucci M, Caiaffa-Junior HH, Rossi F. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Clinics. 2012; 67(12): 1427–1431.
351. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2016;15:20 DOI: 10.1186/s12941-016-0136-2
352. Birgy A, Bidet P, Genel N et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012, 50 (4):1295–1302.
353. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clin Microbiol Infect. 2010; 16 (2): 112–122.
354. Wang P, Chen S, Guo Y et al. Occurrence of false positive results for the detection of carbapenemases in carbapenemase-negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. PloS one, 2011; 6(10): e26356
355. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M et al. Controlling the false positive results of the Hodge and Masuda assays for class A carbapenemase detection in species of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2010; 48(4): 1323–1332.

356. Queenan AM, Foleno B, Gownley C et al. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1):269-75.
357. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(2): 249–251.
358. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014, 44(2):51–56.
359. Lee K, Kim CK, Yong D et al. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods.* 2010; 83(2): 149–152.
360. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(4): 552–556. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x.
361. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(7):1319-21. doi: 10.1093/jac/dkq124.
362. Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(2): 362–367.
363. Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005; 53(3): 241–244.
364. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C et al. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(11): 4388–4390.
365. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 40–43.
366. Yong D, Lee K, Yum JH et al. Imipenem- EDTA disk method for differentiation of metallo- β - lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol.* 2002; 40(10):3798–3801 doi: 10.1128/JCM.40.10.3798-3801.2002
367. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7): 3129-3135.
368. Doi Y, Potoski BA, Adamas-Haduch JM et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type β -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(12): 4083-4086.
369. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(9): 2986-2990.
370. Elsherif R, Ismail D, Elawady S et al. Boronic acid disk diffusion for the phenotypic detection of polymerase chain reaction-confirmed, carbapenem-resistant, gram-negative bacilli isolates . *BMC Microbiology* 2016; 16(1):135
371. Glasner C, Albiger B, Buist G et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill.* 2013; 11;18(28). pii: 20525.
372. Liao IC, Chen HM, Wu JJ, Tsai PF, Wang LR, Yan JJ. Metallo-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates at a Taiwanese hospital: lack of distinctive phenotypes for screening. *APMIS* 2011; 119(8):543–550.
373. Peter S, Lacher A, Marschal M et al. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo- β -lactamases (MBLs) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(7):1133-41. doi: 10.1007/s10096-014-2059-1.
374. Mammeri H, Nordmann P, Berkani A et al. Contribution of extended spectrum AmpC (ESAC) beta-lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 282(2): 238–240.

375. Saito R, Koyano S, Dorin M et al. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods*. 2015; 108: 45-48.
376. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M et al. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 4048-4050.
377. Richter SN, Frasson I, Franchin E et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009– December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog*. 2012; 4: 7.
378. Wang Y, Cao W, Zhu X et al. Characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* sequence type 476 carrying both bla_{KPC-2} and bla_{IMP-4}. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31: 1867-1872.
379. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 1664-1671.
380. Zioga A, Miriagou V, Tzelepi E et al. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 36: 190-191.
381. Potron A, Poirel L, Rondinaud E et al. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001-2011. *Euro Surveill*. 2013; 18:9.
382. Souli M, Galani I, Antoniadou A et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K.pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(3): 364-373.
383. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R et al. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(5): 2420-2423.
384. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37(5): 415-419.
385. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 39 (2): 168-172. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.10.005.
386. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H et al. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19(5): E230-E232.
387. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(4): 1059-1063.
388. Woodford N, Pike R, Meunier D et al. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* and *Enterobacter spp.*, and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(2):564-567. doi: 10.1093/jac/dkt383
389. Andrews JM, Jevons G, Walker R, Ashby J, Fraiese AP. Temocillin susceptibility by BSAC methodology. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:185-7.
390. Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, et al. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64(3) 657-658.
391. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH et al. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(1):5-11.
392. Notake S, Matsuda M, Tamai K et al. Detection of IMP Metallo-β-Lactamase in Carbapenem-Nonsusceptible *Enterobacteriaceae* and Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Rods by Immunochromatography Assay *J Clin Microbiol* 2013; 51(6): 1762-1768.

393. Gazin M, Paasch F, Goossens H et al. Current trends in culture based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1140-6. doi: 10.1128/JCM.06852-11.
394. Day KM, Ali S, Mirza IA et al. Prevalence and molecular characterization of *Enterobacteriaceae* producing NDM-1 carbapenemase at a military hospital in Pakistan and the evaluation of two chromogenic media. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75(2):187-91. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.006.
395. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J et al. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for the detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(6): 2239–2242.
396. Vroni G, Ioannis Daniil I, Voulgari E et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(6): 1841–1846.
397. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of Carbapenemase Producers in Enterobacteriaceae by Use of a Novel Screening Medium *J Clin Microbiol*. 2012; 50(8): 2761–2766
398. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. 2013; 75 (2): 214–217
399. Ruppe E, Armand-Lefevre L, Lolom I et al. Development of a phenotypic method for detection of fecal carriage of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* after incidental detection from clinical specimen. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(7): 2761–2762.
400. Poirel L, Nordmann P. 2015. RAPIDEC CARBA NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(9):3003-3008. doi: 10.1128/JCM.00977-15.
401. Dortet L, Brécharde L, Cuzon G et al. Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4): 2441-2445.
402. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(9):3097–3101.
403. Tijet N, Boyd D, Patel SN et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(9):4578–4580.
404. Hombach M, von Gunten B, Castelberg C et al. Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2015; 53(12):3828 –3833. doi:10.1128/JCM.02327-15.
405. Yusuf E, Van Der Meeren S, Schallier A et al. Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(12): 2237-2240. doi:10.1007/s10096-014-2199-3
406. Dortet L, Agathine A, Naas T et al. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70 (11): 3014-3022. doi: 10.1093/jac/dkv213
407. Pasteran F, Tijet N, Melano RG et al. Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(12):3908–3911. doi:10.1128/JCM.02032-15.
408. Woodford N, Eastaway AT, Ford M et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek2 and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2010; 48(8): 2999–3002.
409. Sun J, Xu Y, Yu Y et al. Accuracy of *in vitro* susceptibility tests for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria *J Med Microbiol*. 2015; 64, 620–622.

410. He Q, Chen W, Huang L et al. Performance evaluation of three automated identification systems in detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15:40 DOI: 10.1186/s12941-016-30154-0
411. Nakamura T, Takahashi H. Screening of antibiotics resistance to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* by an advanced expert system. *J Infect Chemother* 2005; 11:288–292 DOI 10.1007/s10156-005-0415-x
412. Pasteran F, Lucero C, Soloaga R et al. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *J Clin Microbiol*. 2011 Feb; 49(2): 697–701
413. Valenza G, Müller S, Schmitt C et al. Evaluation of the VITEK 2 AST-N111 card for detection of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in and compared to ESBL Etests and combination disk methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30 (7): 869-872
414. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG et al. Phenotypic Detection of metallo- β -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* *ScientificWorld Journal*. 2012; 2012: 654939. doi: 10.1100/2012/654939
415. Sheikh AF, Rostami S, Jolodar A et al. Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(11): e12289
416. Qu TT, Zhang JL, Wang J et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1136–1142. doi: 10.1128/JCM.01592-08.
417. Behera B, Mathur P, Das A et al. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* *Indian J Med Microbiol*. 2008;26(3):233-7.
418. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov; 50(11): 3773–3776.
419. Falahat S, Shojapour M, Sadeghi A. Detection of KPC Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples using Modified Hodge test and boronic acid phenotypic methods and their comparison with the polymerase chain reaction. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Mar 3;9(9):e27249.

PRILOG 1 Slike

- Slika 4.1. Modifikovani Hodge-test- deformacija zone na mestu inokulisanog soja
- Slika 4.2. Pozitivan MIC MBL test- količnik MIK IMI/IMD 256/1,5, pojava „fantom“ zone
- Slika 4.3. Kolorimetrijski test za dokazivanje karbapenemaza (RAPIDEC® CARBA NP test)
- Slika 4.4. Prikaz porasta na hromogenom agaru: levo- plavo-zeleno- *K.pneumoniae*; desno- crveno-*E. coli*
- Slika 5.1. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena kod referentnih sojeva
- Slika 5.2. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena
- Slika 5.3. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} i *bla*_{OXA-48} gena (*multiplex* PCR)
- Slika 5.4. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{NDM} gena, *bla*_{KPC} gena i *bla*_{OXA-48} gena (*multiplex* PCR)
- Slika 5.5. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC} gena
- Slika 5.6. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{OXA-48} gena
- Slika 5.7. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{NDM} gena
- Slika 5.8. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{NDM} gena
- Slika 5.9. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{VIM} gena
- Slika 5.10. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{VIM} gena
- Slika 5.11. Negativan modifikovani Hodge test (MHT)-nema deformacije zone inhibicije
- Slika 5.12. Slabo pozitivan (+/-) modifikovani Hodge test (MHT)-diskretno vidljiva deformacija zone inhibicije
- Slika 5.13. Pozitivan (+) modifikovani Hodge test (MHT)-jasno vidljiva deformacija zone inhibicije
- Slika 5.14. Jako pozitivan (++) modifikovani Hodge test (MHT)-jako izražena deformacija zone inhibicije
- Slika 5.15. Prikaz pozitivnog fenotipskog testa sinergizma za detekciju produkcije metalo-β-laktamaza – NDM pozitivan soj
- Slika 5.16. Prikaz fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza – OXA-48
- Slika 5.17. Prikaz fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza A klase
- Slika 5.18. Prikaz fenotipskih testova sinergizma za detekciju produkcije karbapenemaza kod izolata sa više enzima
- Slika 5.19. Prikaz kombinovanog disk testa za detekciju produkcije karbapenemaza
- Slika 5.20. Pozitivan MIC MBL test kod NDM pozitivnog izolata *K.pneumoniae* ; IMI/IMD 48/2
- Slika 5.21. Prikaz pozitivnog Carba NP testa
- Slika 5.22. Prikaz porasta na hromogenom agaru: a) braon prebojen izolat- *M. morganii*; b) plavo - *K.pneumoniae*, c) plavo-ljubičasto- *C.freundii*
- Slika 5.23. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{KPC} gena
- Slika 5.24. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{NDM} gena
- Slika 5.25. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{VIM} gena
- Slika 5.26. Elektroforeza produkata nakon umnožavanja *bla*_{VIM} gena

PRILOG 2 Tabele

Tabela 4.1. Kontrolni sojevi korišćeni za optimizaciju multiplex PCR reakcije

Tabela 4.2. Sekvence prajmera

Tabela 4.3. Interpretacija fenotipskih testova sa inhibitorima

Tabela 4.4 Interpretacija KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit: Carbapenemases testa

Tabela 5.1. Osetljivost enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na antimikrobne lekove testirana disk difuzionom metodom

Tabela 5.2. Osetljivost enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na antimikrobne lekove određena Vitek2 sistemom

Tabela 5.3. Najčešći fenotipovi rezistencije enterobakterija sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

Tabela 5.4. Zastupljenost izolata prema bakterijskim vrstama

Tabela 5.5. Distribucija MIK ($\mu\text{g/ml}$) vrednosti određenih VITEK 2 AES sistemom

Tabela 5.6. Zastupljenost gena koji kodiraju karbapenemaze kod pojedinih vrsta enterobakterija

Tabela 5.7. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza pozitivnih izolata, pozitivnih i negativnih kontrola

Tabela 5.8. Osetljivost na karbapeneme karbapenemaza negativnih izolata

Tabela 5.9. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema bakterijskoj vrsti

Tabela 5.10. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema vrsti enzima

Tabela 5.11. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema broju pozitivnih/negativnih i lažno pozitivnih/lažno negativnih izolata

Tabela 5.12. Senzitivnost i specifičnost Vitek2 AES sistema

Tabela 5.13. Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koji produkuju samo jedan tip enzima

Tabela 5.14. Modifikovani Hodge-test kod karbapenemaza pozitivnih izolata koje produkuju više različitih tipova enzima

Tabela 5.15. Modifikovani Hodge test kod karbapenemaza negativnih izolata

Tabela 5.16. Senzitivnost i specifičnost MHT testa

Tabela 5.17. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju samo jedan tip enzima

Tabela 5.18. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje produkuju više različitih tipova enzima

Tabela 5.19. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata

Tabela 5.20. Senzitivnost i specifičnost DPA testa

Tabela 5.21. Senzitivnost i specifičnost EDTA testa

Tabela 5.22. Senzitivnost i specifičnost testa sinergizma boronične kiseline

Tabela 5.23. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Tabela 5.24. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Tabela 5.25. Kombinovani disk test kod karbapenemaza negativnih bakterija

Tabela 5.26. Senzitivnost i specifičnost kombinovanog disk testa sa dipikoloničnom kiselinom

Tabela 5.27. Senzitivnost i specifičnost CDT sa boroničnom kiselinom

Tabela 5.28. Senzitivnost i specifičnost CDT sa temocilinom

Tabela 5.29. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Tabela 5.30. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Tabela 5.31. Dupli disk-difuzioni test kod karbapenemaza negativnih bakterija

Tabela 5.32. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode samo jedan tip enzima

Tabela 5.33. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih bakterija koje proizvode više različitih tipova enzima

Tabela 5.34. Test MIC MBL kod karbapenemaza negativnih bakterija

Tabela 5.35. Senzitivnost i specifičnost kombinovanog disk testa sa EDTA

Tabela 5.36. Rezultati Carba NP testa

Tabela 5.37. Struktura pet izolata karbapenemaza pozitivnih izolata negativnih posle 120 minuta

Tabela 5.38. Senzitivnost i specifičnost chromID CARBA agara

Tabela 5.39. Procenat rezistencije izolata vrste *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme na AML disk difuzionom metodom

Tabela 5.40. Osetljivost na AML *P.aeruginosa* određena AST-N240 karticom Vitek 2 sistema

Tabela 5.41. Najčešći fenotipovi rezistencije *P.aeruginosa* sa smanjenom osetljivošću na karbapeneme

Tabela 5.42. Distribucija MIK vrednosti određenih Vitek 2 AES sistemom za ispitivane AML

Tabela 5.43. Osetljivost na karbapeneme svih 14 ispitivanih izolata *P.aeruginosa*

Tabela 5.44. Fenotip rezistencije određen Vitek 2 AES sistemom u poređenju sa PCR metodom prema vrsti enzima

Tabela 5.45. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza pozitivnih *P.aeruginosa*

Tabela 5.46. Fenotipski test sinergizma kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa*

Tabela 5.47. Kombinovani disk test kod karbapenemaza pozitivnih izolata *P.aeruginosa*

Tabela 5.48. Kombinovani disk test kod karbapenemaza negativnih izolata *P.aeruginosa*

Tabela 5.49. Test MIC MBL kod karbapenemaza pozitivnih izolata vrste *P.aeruginosa*

Tabela 5.50. Test MIC MBL kod karbapenemaza negativnih izolata vrste *P.aeruginosa*

Tabela 5.51. Rezultat kolorimetrijskog testa za dokazivanje karbapenemaza

BIOGRAFIJA AUTORA

Doktor Snežana Mladenović-Antić rođena je u Popšici (opština Svrljig) 21.1.1964. godine. Osnovnu školu završila je u Svrljigu sa odličnim uspehom, kao nosilac Vukove diplome. Gimnaziju "Svetozar Marković" završila je u Nišu odličnim uspehom 1982. godine.

Medicinski fakultet u Nišu završila je 1988. godine, sa prosečnom ocenom 9,00.

Do 1995. godine radila je u Domu zdravlja „dr Ljubinko Djordjević“ u Svrljigu kao lekar opšte medicine.

Od 1995. godine radi u Institutu za javno zdravlje u Nišu. Specijalistički ispit iz Mikrobiologije sa parazitologijom položila odličnim uspehom 1999. godine i od tada radi kao specijalista mikrobiologije sa parazitologijom, u Centru za mikrobiologiju, trenutno u laboratoriji za piokulture i laboratoriji za antibiogramе.

Magistarske studije iz mikrobiologije sa imunologijom završila je 2004. odbranom rada: "Pojava rezistentnih sojeva *Streptococcus pneumoniae* i njen uticaj na prevenciju i terapiju pneumokoknih oboljenja".

Stručni radovi u kojima je autor ili koautor, objavljeni su u stručnim časopisima, od kojih je 8 na SCI listi. Na domaćim i međunarodnim kongresima mikrobiologa, prezentovala je stručne radove, čiji apstrakti su objavljeni u zbornicima radova. Danas radi kao specijalista mikrobiologije u Centru za mikrobiologiju Instituta za javno zdravlje u Nišu. Član je mikrobiološke sekcije SLD.

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом „Детекција механизма резистенције на карбапенеме код ентеробактерија и врсте *Pseudomonas aeruginosa*“

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Снежана Ђ. Младеновић - Анђелић
(Име, средње слово и презиме)

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА ДОКТОРСKE
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: „Детекција механизма резистенције на карбапенеме код
ентеробактерија и врсте *Pseudomonas aeruginosa*“

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**,
истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Снежана Ђ. Младеновић - Анђелић
(Име, средње слово и презиме)

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

„Детекција механизма резистенције на карбапенеме код ентеробактерија и врсте *Pseudomonas aeruginosa*“

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)ⁱ**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Снежана Б. Милетић - Анђелић

(Име, средње слово и презиме)