

Dobrodošli u nadolazeće treće doba antimikrobne terapije

Ivan KOSALEC, izv. prof. dr. sc., mag. pharm.

Zavod za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi

*antimikrobna terapija
alternativni pristup
otpornost mikroba na antibiotike
rezistencija*

Key words

*antimicrobial therapy
alternative approach
microbial resistance to antibiotics
resistance*

Primljeno: 2015–11–03

Received: 2015–11–03

Prihvaćeno: 2015–12–15

Accepted: 2015–12–15

Pregledni rad

Problem otpornosti mikroba na antibiotike može se sagledati kao globalni, kompleksan i sistemski problem s društvenim, kulturnim, socijalnim i političkim posljedicama. Nekoliko je strategija kako prevladati otpornost mikroba na antibiotike, no danas postoji potreba za globalnom strategijom u solidarnoj borbi protiv ove sporo-razvijajuće i progresivne nepogode. Budući da na sve uključene dionike u ovom dinamičnom procesu postoji javni pritisak, ujedno je taj pritisak usmjeren i na znanstvenu zajednicu. Odgovor je na povratak na specifičnu terapiju putem primjene terapijskih monoklonalnih protutijela, ali i primjene inhibitora mikrobne virulencije, bakteriofagnih lizina, antimikrobnih peptida, potencijatora učinka antibiotika, imunomodulatora i dr. Ti pristupi, od kojih je većina orijentirana mikrobno-specifično, uvode nas u treće doba antimikrobne terapije koje se polako rađa napuštajući dominaciju antibiotske molekularne paradigme.

Welcome to the emerging third era of antimicrobial therapy

Review paper

The problem of antimicrobial resistance (AMR) could be seen as a global, complex and systemic problem with social, cultural and political consequences. There are several strategies how to overcome AMR, but today we need a unique global and solidary strategy to combat this slowly emerging and progressive disaster. Because all stakeholders in this dynamic challenging process are involved, scientists are also under public pressure to resolve this problem. Nowadays, scientific approach to combat AMR is focused on the need for a specific therapy. This approach includes the use of therapeutic monoclonal antibodies, microbial virulence inhibitors, bacteriophage lysins, antimicrobial proteins, potentiators of current antibiotics, immunomodulators, etc. These approaches, most of which are microbe-specific oriented, introduce us to the third era of antimicrobial therapy, which slowly arises from the domination of molecular paradigmatic era of antibiotics.

Kriza kao pokretač promjena

Prema Thomasu S. Kuhnu [1] kriza je osnovni pokretač i svojevrsni preduvjet nadolazećim novim teorijama te se ujedno kroz nju i zahvaljujući njoj propituju mogući odgovori i modaliteti budućih rješenja. Kriza kao i reagiranje na nju je osnovni pokretač nadilaženja starih i razvoja novih paradigmi kao odgovora na nemogućnost iznalaženja odgovora na činitelje krize. Kriza unutar (ne)mogućnosti primjene registriranih antimikrobnih lijekova¹ uslijed otpornosti mikroba na njih te povećanje pobola, mortaliteta i posljedičnih komplikacija unutar zdravstve-

ne skrbi uvjetovanih terapijskim neuspjehom sveopći je i široj javnosti prepoznat problem. Otpornost mikroba na antimikrobne lijekove danas je multidimenzionalan, sistemski, kompleksan i globalni problem. Na svjetskom nivou, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) prepoznala je problem kao globalnu javno-zdravstvenu prijetnju za koju je potreban vertikalni odgovor kroz sva državna tijela te je dat naglasak na što aktivnijoj ulozi dionika unutar društva u cjelini² [2]. Naime, dosadašnja epidemiološka praćenja otpornosti mikroba na antimikrobne lijekove dobro su povezana, a sama tehnička podrška se usavršava tako da se informacije o otpornosti mikrobnih

¹ U ovom radu će se pod antimikrobni lijekovi govoriti uglavnom o antibioticima i otpornosti mikroba na tu skupinu antimikrobnih lijekova (istoznačnica je i uvriježen pojam antimikrobna rezistencija)

izolata na antibiotike prikupljaju preko *The Global Antimicrobial Resistance Surveillance System* (GLASS) te čine osnovu za analizu i posljedično odlučivanje osnovano na dokazima i to na lokalnoj, nacionalnoj i regionalnoj razini [3]. Na Europskom nivou opstoji mreža *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) unutar Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) [4] koji je osnovan prema odluci broj 2119/98/EC Europskog parlamenta i Koncila [5] te Europske regulative broj 851/2004 [6]. Širenje otpornosti mikroba na osnovu sakupljenih podataka pojedinih članica EU su prikazani kao otpornost mikrobne vrste na skupinu antibiotika (npr. treća generacija cefalosporina) ili pojedinih antibiotika (npr. vankomicin). Podaci za potrošnju antibiotika na nacionalnoj razini prikupljaju se preko *The European Surveillance System* (TESSy) kojeg je Republika Hrvatska članica. Interaktivne baze podataka za pojedine zemlje članice se objavljuju na godišnjoj razini koristeći anatomsko-terapijsko-kemijsku (ATK) podjelu antibiotika do 4.-te hijerarhijske razine, a Republika Hrvatska objavljuje podatke od 2000. godine za primarnu zdravstvenu zaštitu kao i za bolničke primjene. Globalno gledajući, otpornost etiološkog uzročnika malarije (*Plasmodium* spp.) na antimalarike je svjetski prepoznat problem pogoršan i pojavom otpornosti na prvu liniju liječenja (artemisinin-kombinirajuća terapija). No, nadu budi nekoliko djelatnih tvari u fazi II/fazi III kliničkih ispitivanja kao i registracija cjepiva za prevenciju malarije uzrokovane vrstom *P. falciparum* u djece sub-saharske Afrike (djelatna tvar je cirkum-sporozoitni protein CSP srašten sa S-proteinom hepatitisa B kao RTS, S cjepivo s adjuvansom AS01 pod nazivom Mosquirox™) [7]. Neke kombinacije antimalarika već u fazi registracije ili su odobrene od strane Europske ili Američke agencije za lijekove (npr. artemeter-lumefatrin, dihidroartemisinin-piperakvin, pironaridin-artesunat, artesunat-amodijavin, artesunat injektibilni) [8, 9]. Osim malarije, na svjetskom planu je porast otpornosti HIV-a na specifičnu terapiju, te sve veća pojava višestruko-otpornih sojeva *Mycobacterium* spp. s posljedičnim višestruko-otpornim sojevima, posebice i na izonijazid i refampicin (tzv. MDR-TB), no i razvoj sojeva otpornih i na

drugu liniju terapije (tzv. XDR-TB sojevi); nadalje otpornost uzročnika gonoreje na 3. generaciju cefalosporina uz rastuću, gotovo epidemijску pojavu sve veće otpornosti uzročnika infekcija mokraćnog sustava, pneumonija, bakterijemija, odnosno povećan udio MRSA i otpornosti gram-negativnih bakterijskih vrsta i ESKAPE patogena³ [2]. Posljedično tomu, produženo je liječenje nekih bolesti uz povećane troškove kao i povećan mortalitet. Nadalje, uspješnost antimikrobne terapije je u drugoj polovici XX. stoljeća postala sve više upitna, a Arturo Casadevall [10] navodi nekoliko razloga. Prvi je epidemija imunokompromitiranih pacijenata, gdje je uspješnost antimikrobne terapije često manje učinkovita, nadalje pojava novih etioloških uzročnika kao i ponovno javljanje "starih" patogena te naposljetku široka rasprostranjenost višestruko-otpornih mikrobnih sojeva [10]. Stoga se Kuhnove pretpostavke krize sa samog početka ovog preglednog rada čine posvema realnima, a pogotovo ako je čitatelj epidemiolog, infektolog ili mikrobiolog. Dakako, epidemiološke studije i prikupljeni nacionalni, regionalni te svjetski izvještaji upozoravaju na gubljenje bitke te time otvaraju pitanja koja su se do sada propitivala unutar zdravstvene struke (liječnici koji propisuju terapiju, medicinskih mikrobiologa, medicinskih i ne-medicinskih dionika upravljanja rizicima); znanstvene zajednice te sistemski gledano svih onih koji su ili će tek postati dionici razvoja otpornosti mikroba na antimikrobnu terapiju (primjena antibiotika u poljoprivredi i akvakulturu te posebice unutar veterinarske medicine⁴). Stoga je i kriza unutar neuspješne terapije infekcija ujedno i globalni problem. Dokaz tomu su i reagiranja WHO i njenih pod-odbora⁵, *Food and Agriculture Organization* (FAO)⁶ Ujedinjenih naroda (uz *World Organisation for Animal Health*, OIE), Američki i Europski centri za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, ECDC), Europska agencija za lijekove (EMA) te brojne udruge vladinih i nevladinih organizacija kao npr. *Antibiotic Resistance Coalition*⁷, *ReAct Group*⁸, *The European Academies Science Advisory Council* (EASAC)⁹, *Innovative Medicines Initiative*, *Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance* (JPIAMR) i druge. Brojne su i deklaracije koje potpisuju WHO, OIE, ESCD i druge javne

² globalnu strategiju i prijedloge akcijskog plana na svjetskom nivou predložili su S. J. Hoffman i sur. (Hoffman SJ, Caleo GM, Daulaire N, Elbe S, Matsoso P, Mossialos E, Rizvi Z, Rootingen J-A, Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance, *Bull World Health Organ* 2015;93:867-876), dok dosadašnje razloge koji su doveli do povećanja otpornosti mikroba objašnjavaju D. Wallinga i sur. (Wallinga D, Rayner G, lang T, Antimicrobial resistance and biological governance: explanations for policy failure, *Public Health* 129; 2015:1314-25)

³ ESKAPE patogeni čine: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp., osim toga mehanizmi otpornosti ne uključuju samo tvorbu karbapenemaza, ESBL-proširenog spektra β-laktamaza ili metalo-β-laktamaza) već i promjene permeabilnosti stanične stijenke i povećan efluks pumpi, dok su otpornost na kolicin i tigeciklin već zabilježeni, a što izrazito otežava terapiju ili ju čini nemogućom.

⁴ Odnos mikrobiota u okolišu kao izvora gena za otpornost na antibiotike opisuje Wright (26)

⁵ <http://www.who.int/drugresistance/en/>

⁶ <http://www.fao.org/antimicrobial-resistance/en/>

⁷ <http://www.reactgroup.org/uploads/ARC-declaration/ARC-declaration-May-22-2014.pdf>

⁸ <http://www.reactgroup.org/#>

⁹ <http://www.easac.eu/home/reports-and-statements/detail-view/article/antimicrobia.html>

ili privatne fondacije, farmaceutske i biotech tvrtke ili one koje proizvode dijagnostičke testove. Jedan od primjera je i *Declaration by the Pharmaceutical, Biotechnological and Diagnostics Industries on Combating Antimicrobial Resistance*¹⁰ (siječanj 2016.), kao i ranije deklaracije G7 skupine u Berlinu 2015.-te pod geslom GUARD (*Global Union for Antibiotics Research and Development*)¹¹.

U Republici Hrvatskoj hvale su vrijedne inicijative za racionalizaciju primjene antibiotika za zdravstvene djelatnike putem smjernica *Interdisciplinarnе sekcije za kontrolu rezistencije na antibiotike* (ISKRA) Ministarstva zdravlja, dok su javne kampanje (putem televizije¹², radijskog programa, javnih kampanja na gradskim trgovima te unutar stručnih društava ili na javnim gradskim panoima kao i unutar zdravstvenih ustanova kao što su ordinacije ili ljekarne) usmjerene na građane (tijekom Europskog dana svjesnosti o antibioticima 18. studenoga) ili ciljne skupine građana (npr. djeca sa publikacijom *Kako je Ješko pobijedio prehladu*)¹³). Globalnost problema je prepoznata i u Hrvatskoj gdje su unutar ISKRA odbora stručnjaci iz niz struka i državnih tijela te se problemu otpornosti antibiotika pristupa inter- i multidisciplinarno sa simpozijem jednom godišnje kao i izvještajima i znanstvenim pristupom tijekom simpozija ili kongresa.

No, krenimo od prvotne točke u razrješenju problema – kako je ljudski razum do sada reagirao te kako je terapeutski paradigmatički pristup doveo do kolateralnih žrtava – otpornost mikroba na antibiotike te posljedično sve više istaknutom težnjom za promjenom paradigme unutar svih dionika? Postaviti ćemo si i etička pitanja o problemu koji nas sve pogađa te o moralnim odlukama i dvojabama koje proizlaze iz tih odluka. Moguća rješenja u savladavanju otpornosti mikroba na antibiotike prisutan unutar znanstvene zajednice je također dio ovog rada.

Prvo doba antimikrobne terapije

U sam osvit pronalazjenja etiološkog uzročnika zaraznih bolesti, posljedični paradigmatički odgovor je bio kako spriječiti razvoj kliničke manifestacije, dakle ne kako prevenirati, već kako odagnati simptome i oštećenje tkiva ili organa nositelja (molekularni postulati unutar mikrobne patogeneze su bili u povojima). Ovdje dominiraju postupci primjene imunoglobulina iz seruma konja, tzv. serum-ska terapija protiv uzročnika kojima je dominantan virulentni čimbenik toksin. Prepoznajući taj čin kao izuzetan napredak u medicini, 1901. godine Emilu von Behringu je dodijeljena Nobelova nagrada za razvoj i primjenu anti-

difteričnog seruma. U to vrijeme paradigma liječenja zaraznih bolesti je bila usmjerena ka primjeni protu-toksičnog konjskog seruma protiv difterije, hemolitičnog streptokoka, dizenterije uzrokovane šiga-toksinom, tetanusa, plinske gangrene, primjena "antimikrobnog" konjskog seruma protiv pneumokoknih, meningokoknih te infekcije uzrokovanih leptospirama i protu-virusnih seruma od konvalescenata za liječenje ospica, žute groznice, protiv dječje paralize, influence i štenećaka u pasa [9]. No, sigurnost same primjene bila je upitna zbog posljedične anafilakse uslijed stvaranja protutijela (IgE) na konjske proteine, alergijskih reakcija, tvorbe IgG te imunih kompleksa i Arthusove reakcije na mjestu primjene. No, otkriće monoklonalnih protutijela 80.-ih godina prošlog stoljeća uvelike je promijenilo stav o racionalnoj primjeni konjskih protutijela u čovjeka, posebice uslijed spoznaja o sigurnosti primjene [9]. Upravo ta sigurnost primjene otvorit će pitanje i učinkovitosti terapije kao jednog od glavnih ciljeva ocjene kakvoće lijekova (i cjepiva, dakako) kako ih danas poimamo. Naime, sve od 1890.-tih godina, erzipel i bedrenica su također bile liječene serumskom terapijom dok se promjena paradigme dogodila intenzivnim laboratorijskom radom i sintezom te racionalizacijom sinteze sulfonamida i posljedičnom učinkovitošću primjene tih niskomolekularnih, dobro definiranih molekula kao djelatnih tvari u ranim 30.-tim godinama prošlog stoljeća. Valja naglasiti da su i u prijelaznom razdoblju, od serumске terapije do dobro definirane primjene sintetskih djelatnih tvari bili pokušaji primjene npr. salvarzana za liječenje sifilisa, kinina za liječenje malarije te optohina za pneumokokne infekcije. Stoga su sulfonamidi bili okosnica ulaska u novo paradigmatičko razdoblje liječenja infekcija. Štoviše, serumska terapija se nikako nije mogla nositi sa cijenom, stabilnošću lijekova, jednostavnošću sinteze i primjene te relativno niski toksičnosti sulfonamida kao djelatnih tvari [11]. Vrata druge ere antimikrobne terapije širom su bila otvorena posebice ulaskom penicilina izoliranog biosintetskim putem tijekom II. Svjetskog rata i široke kliničke upotrebe istog. No, s jedne strane promjena paradigme je vrlo uočljiva, lijek je ona tvar kojoj se mogu definirati učinci uočljivi kliničaru, a s druge strane farmaceutska kakvoća koja je bila u povojima te posljedično tomu i pokušaj definiranja farmakokinetike djelatne tvari. No, ono što je odvajalo te dvije paradigme jest specifičnost terapije. Naime, prva era terapije primjena uglavnom homoloških protutijela iz konjskog seruma je bila mikrobnospecifična te time i ciljana s obzirom na etiološkog uzročnika ili na njegove toksine. Dakle, difterično dijete se liječilo difteričnim anti-serumom. Pomak u drugo doba ili

¹⁰ http://amr-review.org/sites/default/files/Declaration_of_Support_for_Combating_AMR_Jan_2016.pdf

¹¹ http://www.bmg.bund.de/fileadmin/dateien/Downloads/G/G7-Ges.Minister_2015/G7_Health_Ministers_Declaration_AMR_and_EBOLA.pdf

¹² npr. za Europski dan svjesnosti o antibioticima 18.11.2015. prikaz na HTV: <http://www.hrt.hr/309118/magazin/europski-dan-svjesnosti-o-antibioticima>

¹³ <http://ecdc.europa.eu/hr/eaad/National%20campaign%20materials/jesko-print.pdf>

eru antimikrobne terapije označila je primjena mikrobnospecifične terapije s djelatnim tvarima odnosno antimikrobnim sredstvima s posve drugačijim mehanizmima djelovanja usmjerenim ka širokoj populaciji mikrobnih vrsta, dakle nespecifičnog djelovanja s izrazito brojnim kolateralnim žrtvama unutar ljudskog mikrobioma. Mehanizam eradikacije nije bio više primjena mikrobnospecifičnih protutijela (čak i sub-specifične terapije nakon tipizacije mikrobnih vrsta na osnovu antigena) već mikrobicidnih tvari s nespecifičnim djelovanjem i širokim spektrom djelovanja na brojne mikrobiote. Dakle, kolateralne žrtve tijekom nespecifične terapije primjenom širokospektralnih antibiotika, a pogotovo uslijed sve većeg empirijskog pristupa, a ne patogen-specifičnog odnosno kauzalnog imala je za posljedicu (i ima još i danas) prilagodbu mikroba na antimikrobne lijekove, a što možemo gledati i u svjetlu darvinističke teorije prilagodbe na pojačan impuls iz okoliša.

O čemu govori pomak u treće doba antimikrobne terapije?

Prije svega, još uvijek je izraženo mišljenje da mikrobiote unutar (ne)poznatih ekoloških sustava nude mogućnost tvorbe producenata novih antimikrobnih tvari sa čak i novim mehanizmima baktericidnog učinka. Dakle, "stara" paradigma zasnovana na molekuli koja je lijek i koja djeluje mikrobicidno još uvijek zaokuplja znanstveni prostor te se i dalje financiraju takva temeljna znanstvena istraživanja. Sama spoznaja da je identificirano tek mali broj pripadnika koljena Actinobacteria te im određen metabolički kapacitet tvorbe biološki aktivnih molekula sekundarnog metabolizma daje ozbiljnu nadu u pronalazak novih antibiotika. Valja spomenuti da su do sada streptomycete bile izvor dobro poznatih biološki aktivnih molekula koji su registrirani kao lijekovi, spomenimo neke kao antibiotike vankomicin, eritromicin, tetraciklin; antimikotik amfotericina B; citostatik mitomicina C i antiparazitik ivermektin kao i imunosupresiv rapamicina [12, 13].

Hoegberg i sur. [14] naglašavaju kako globalni problem otpornosti mikroba ujedno treba rješavati na globalnom nivou te savjetuje nekoliko mjera koje bi ispravile taj gorući problem, a uključuju a) dijeljenje znanstvenih informacija o otkrićima potencijalnih lijekova između tvrtki i studenata (na engl. *open source platform in drug discovery*); b) dijeljenje podataka o zbirkama biološki-aktivnih tvari¹⁴, c) omogućiti financijsko poticanje ranog razvoja novih antibiotika od strane vlada, fondova i međunarodnih inicijativa, d) proširiti financijski rizik između zajednice i

istraživača novih antibiotika, e) osnivanje međunarodne inicijative traganja za novim antibioticima te proporcionalno povećanje napora u manje razvijenim zemljama kao i sveučilišnim zajednicama koje proučavaju otpornost mikroba na antibiotike [14]. Nadalje, težnja ka optimizaciji antimikrobne terapije poznavajući farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka, smanjenju pogrešne primjene antibiotika kao i pretjerane primjene, povećanje kliničke učinkovitosti i sigurnosti lijekova uz edukaciju te pouzdaniju i bržu mikrobiološku dijagnostiku mogu pridonijeti smanjenju širenja otpornih mikrobnih sojeva [15]. No i farmaceutska industrija ima ulogu u nedovoljnom praćenju istraživanja, a za što je odgovorno niz čimbenika [16].

Nadolazeći paradigmatički pomak u razmišljanju rješavanja liječenja infekcija uzrokovanih višestruko-otpornih mikrobnih sojeva otvara i vrata primjeni lijekova koji nisu registrirani za indikaciju infekcija, a pokazuju antimikrobni učinak. Takva ko-administracija lijekova nije novost u terapiji, a najpoznatije kombinacije su inhibitori β -laktamaza, a uključuju klavulansku kiselinu, avibaktam i tazobaktam. Primjeri uspješnih (za sada) kombinacija su komoksiklav i novija kombinacija ceftazidim-avibaktam koja se pokazala učinkovitom na višestruko-otporne sojeve karbapenemaza-producirajućih gram-negativnih bakterijskih sojeva te ceftolozan-tazobaktam kombinacija za liječenje infekcija uzrokovanih višestruko-otpornim sojevima pseudomonasa. Nada je i kombinacija aztreonam-avibaktam [17, 18]. U novije vrijeme sve se više pridaje pažnja širem pogledu na biološke učinke pojedinih tvari koje djeluju antimikrobno s poznatim mehanizmima učinka na molekularnom nivou, međutim kao dodatna vrijednost učinka se smatra i modulacija imunološkog sustava nositelja. Kao jedan od primjera su inhibitori metalohidrolazne klase enzima peptidne deformilaze (koji sudjeluju unutar biosintetskog N-formil-metioninskog koraka sinteze proteina prokariota, ali ne i eukariota). Ko-administracija tih bakteriostatskih selektivnih inhibitora sinteze proteina može potencirati antimikrobni učinak drugih lijekova [19]. Inhibitori enzima peptidne deformilaze djeluju antimikrobno i na intracelularne mikrobe [20] te moduliraju imunološki odgovor nositelja putem povećanja tvorbe neutrofil-aktivirajućih peptida koji aktiviraju neutrofile nositelja kroz formil-peptidne receptore, a što je otvorilo novu granu antimikrobne terapije [21].

Nadalje, Ejim i sur. [22] utvrdili su da kombinacija neantibiotskih tvari uz antibiotike potencira njihov učinak. U studiji Ejima i suradnika dokazano je u *in vitro* uvjetima da je sinergizam antibiotika i ne-antibiotika moguć uz minociklin i disulfiram (inhibitor acetaldehid-dehidrogenaze)

¹⁴ u svom preglednom članku Anna Zorzet (2014) daje moguće smjernice u otkriću novih antibiotika putem kreiranja javno dostupnih baza kemijskih spojeva, u kojima bi se prikazale molekule izolirane iz prirodnih izvora kao što su mikrobnih sojevi iz različitih ekoloških sustava (uključujući i morske) te da bi prikaz trebao biti povezan s biološkim učinkom uz jasnu razliku učinka već otkrivenih prirodnih produkata (Zorzet A, *Overcoming scientific and structural bottlenecks in bacterial discovery and development*, Upsala J Med Sci 19; 2014:170-175).

na sojeve vrste *S. aureus*, uključujući i MRSA sojeve, dok je antimikrobni učinak disulfirama bio slab, no uz minociklin potencira mu se djelovanje. Nadalje, uočeno je i da beserazid (inhibitor DOPA dakarboksilaze) potencira bakterioidni učinak minociklina. Sljedeći primjeri potencijatora minociklina su djelatne tvari kloroksin, tegaserod, askorbinska kiselina i mitomicin C protiv *P. aeruginosa* [22].

Osim biosintetskih puteva izolacija biološki aktivnih tvari iz skupine prirodnih produkata (neki su i antibiotici) uvelike se istražuju računalnim *in silico* mogućim rješenjima na molekularnom nivou [23, 24]. Posebice ohrabruju istraživanja *omics* tehnologijama, gdje bi se potpunim sekvencioniranjem patogena spoznalo o mogućim ciljnim mjestima vezanja (receptori, enzimi, DNK i dr.) novih biološki aktivnih tvari, inhibiranju metaboličkih putova ili mehanizama unutar mikrobne patogeneze i otpornosti na postojeće antibiotike. Mikrobni metabolizam ima također veliku ulogu u otkriću novih mehanizama ili ciljnih mjesta djelovanja postojećih ili molekula koje se tek istražuju jer mogu ukazati na enzime kao potencijalno nove mete inhibitora. No, sve veće spoznaje o nemogućnosti kultiviranja u *in vitro* uvjetima potencijalnih producenta antimikrobnih tvari dovela su do razvoja vektorom-vezujućih postupaka izolacije DNA nekulturable mikrobnih vrsta te umnožavanjem vektorski vezanih fragmenata DNA u donorskoj bakteriji i posljedičnom spoznajom o spektru sekundarnih metabolita inače nekulturable mikrobne vrste. Takva rekombinantna DNA tehnologija nudi nadu u pronalazak baze potpuno novih biološki aktivnih molekula, od kojih su one s antimikrobnim učinkom najpoželjnije [25, 26]. Nadalje, spomenute kombinacije inhibitora s antibioticima otvara širu, iako teoretsku mogućnost primjene i djelatnih tvari u lijekovima koji nemaju registriranu indikaciju anti-infektivnih lijekova, ali ipak posjeduju antimikrobni učinak na gram-pozitivne bakterijske vrste, na gram-negativne ili na obje skupine. To su npr. dobro poznati nesteroidni protu-upalni lijekovi npr. acetil-salicilna kiselina, diklofenak i ibuprofen. No i određeni pripadnici drugih klasa lijekova također pokazuju¹⁵ antimikrobni učinak, npr. antiparazitik ivermektin te bigvandin metformin koji se upotrebljavaju za liječenje dijabetesa neovisnog o inzulinu [18]. Veliki doprinos temeljnim istraživanjima antimikrobnog učinka tvari iz prirodnog izvora su također i metabolit primarnog ili sekundarnog metabolizma biljnih vrsta, najčešće vaskularnih. S tim u vezi, velik broj izoliranih tvari iz biljnog izvora pokazuje antimikrobne učinke u uvjetima *in vitro/in vivo* kao što su npr. arbutin i metil-arbutin iz lista medvjette (*Arctostaphylos uva-ursi* L.) kao

dio komplementarne terapije liječenja rekurentnih cistitisa uzrokovanih uro-patogenim sojevima *E. coli* u žena [27], berberin iz žutike (*Berberis* spp. L) [28, 29], a antimalarik artemisinin je Nobelovom nagradom okrunjena prirodna molekula iz biljnog izvora koja je imala to svojstvo biti i klinički dostupnom nakon zadovoljenja kakvoće, sigurnosti te kliničke učinkovitosti liječenja malarije [30]. Međutim, iako su u *in vitro* uvjetima poznati podaci o antimikrobnom učinku navedenih tvari, sama primjena uz registrirane antibiotike je pravno upitna. Jedina mogućnost je primjena kao *off-label* lijekova no tek kada bi se dokazala potpuna učinkovitost, nus-pojave i druge podatke vezane za doziranje, put primjene [18]. Regulatorna pitanja odnosno brzina dolaska lijeka na tržište je također kamen spoticaja unutar rješenja otpornosti mikroba na antimikrobne lijekove, posebice što se tiče novih indikacija za one već registrirane, novih putova primjene istih, novih kombinacija s već postojećim djelatnim tvarima iz drugih skupina lijekova te spomenuta *off-label* upotreba. Nadalje, put primjene antimikrobnih lijekova kao i načini oslobađanja lijekova su također jedan od izrazito naprednih znanstvenih pristupa, a uključuju liposome kod intracelularnih patogena ili u slučaju mikrobnih biofilma, polimerne nosače [primjer je poli(kaltid) i njegovi polimeri] ili primjenu putem aerosola (npr. aminoglikozida tobramicina kod pacijenata s cističnom fibrozom kako bi se izbjegao negativan učinak mikrobnog biofilma) [31].

Gore navedene mogućnosti ubrajaju se u klasični viziju antimikrobnog liječenja, koja podliježe molekularnoj paradigmi da djelatna tvar djeluje mikrobicidno, ometajući metabolizam mikrobnih stanica na različitim molekularnim nivoima (inhibicija sinteze proteina, DNK, stanične stjenke i dr.). Drugi vid sprečavanja infekcija je primjena antigena s ciljem aktivne imunizacije, dakle prevencija. U tom pogledu pozitivna istraživanja idu u prilog cjepivu protiv MRSA, a ne ometajući mikrobiote drugih vrsta stafilokoka (npr. sojevi vrste *Staphylococcus epidermidis* koji tvore brojne antimikrobne peptide/fenol-topljive moduline *in situ*, hidrolitičke enzime iz klasa proteinaza te time reguliraju eubioze kože, a i neke tvari stimuliraju lokalni imunološki odgovor nositelja inhibirajući pro-upalne citokine inducirane infekcijom žlijezda lojnica s anaerobnom bakterijskom vrstom *Propionibacterium acnes*) koji su sastavni i zaštitni dio mikrobioma kože [32]. No, za razliku od bakterijskih vrsta čija je kapsula jedan od virulentnih čimbenika, a time i dobar antigen (npr. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*), čini se velikim izazovom proizvesti učinkovit antigen kao potencijalno cjepivo protiv MRSA.

¹⁵ antimikrobni učinak ne-antibiotskih tvari u uvjetima *in vitro* se može prikazati prema učinkovitosti u koncentraciji 25 µg/mL ili manjima prema *European Gram-negative Antibacterial Engine* (akronim ENABLE) javno-privatnog projekta unutar Europske unije (pod konzorcijem *Innovative Medicines Initiative*). Također ohrabruje i pokretanje projekta *New Drugs for Bad Bugs* (akronim ND4BB) istog konzorcija (Rex JH, ND4BB: *Addressing the Antimicrobial Resistance Crisis*, *Nature Rev Microbiol* 2014; 12: 231–232).

Stoga se ne može primijeniti kapsularni antigen kao cjepivo već je pristup MRSA cjepivu putem proizvodnje multivalentnog antigena, a izlazak na tržište se očekuje kroz sljedeće desetljeće [33], a i veterinarska medicina je zainteresirana za razvoj takvog cjepiva prvenstveno zbog prevencije mastitisa u krava [34].

No, koja su to stremljenja i pozivi znanstvenoj zajednici unutar globalnog problema otpornosti mikroba na antibiotike, a kriju se kao odgovor na krizu otkrića novih antibiotika? Ne ulazeći u razloge kojima farmaceutska industrija kao i *biotech* tvrtke ne ulažu u istraživanja, jedno od mogućih rješenja je promjena cilja. Ako pretpostavimo da će se istraživanja pronalaska novih antibiotika kao djelatnih tvari usporiti u budućnosti, koja nam to znanstvena promišljanja imaju za cilj promjenu pogleda na problem?

Takav stav ili težnja za fokusiranjem na druga ili alternativna rješenja je poznat u znanstvenoj literaturi već dvadesetak godina. Naime, Arturo Casadevall [10] dovodi u diskurs "zaboravljenog" nositelja, koji je u drugoj i do sada najdužoj eri antimikrobne terapije bio samo "nositelj" patogena, a ti patogeni su bili ciljna mjesta djelovanja antimikrobnih lijekova. Dakle, Casadevall [10] propituje možemo li iskoristiti iskustva prvog doba antimikrobne terapije putem mikrobn-specifične terapije pasivnom imunizacijom protutijelima, možemo li modulirajući imunološki odgovor nositelja pridonijeti eradikaciji. Upravo u tom smislu čini se opravdanim primjena protutijela, dakle specifična terapija ili primjena nespecifičnih modaliteta imunomodulacije putem primjene citokina ili transfuzije granulocita. S time u vezi, toksičnost heterolognih protutijela bi se izbjegla [10], a iskustva pokazuju da administracija ljudskih monoklonalnih protutijela ima učinke, posebice u slučaju infekcije s Ebola virusom [35]. Primjena monoklonalnih specifičnih protutijela uvelike se izučava i u poodmaklim su fazama kliničkih pokusa s ciljem inaktivacije patogena, njihovih virulentnih čimbenika ili toksina. Neki od primjera razvoja protutijela su:

- a) **ShigamAbs** sa caStx1 i caStx2 kimerna monoklonalna protutijela protiv intoksikacija uzrokovanih tvorbom toksina *in situ* shiga-sličnim toksinom patovara STEC ili hemoragične *E. coli*,
- b) **Urtoxazumab** – humanizirana monoklonalna protutijela na Stx2 toksina STEC ili hemoragične *E. coli*,
- c) **Bezloutoumab, aktoksumab** – ljudska monoklonalna protutijela protiv TcdA i TcdB toksina *Clostridium difficile*,
- d) **MEDI4893** – ljudska monoklonalna protutijela na alfa-toksin bakterijske vrste *Staphylococcus aureus*,
- e) **MEDI3902** – anti-Psl i anti-PcrV monoklonalna protutijela (inhibirajuća na T3SS proteinske sekretorne sisteme) bakterijske vrste *Pseudomonas aeruginosa*,
- f) **KBPA101** – ljudska monoklonalna protutijela (IgM/ κ) protiv serotipa O11 vrste *Pseudomonas aeruginosa*,
- g) **Raksibakumab** kao ljudska monoklonalna protutijela koja se vežu na IV demenu PA toksina vrste *Bacillus anthracis*, dok AVP-21D9 monoklonalno protutijelo sprečava stvaranje heptamere PA toksina te posljedično sprečava vezanje na receptor za toksin. Istražuju se i 14B7, MDX1302 te ETI-204 protutijela.

U istraživanju su i ljudska protutijela i stafilokoknog enterotoksina B-SEB (poliklonalna IgG specifična za SEB) [36,37].

Nadalje, utvrđeno je da primjena oligoklonalnih pripravaka uzrokuje bolji terapijski odziv uslijed smanjene potentnosti nekih monoklonalnih protutijela uzrokovanih promjena na mikrobnih epitopima. No, iako se u zadnjih 25 godina uvelike istraživao potencijal primjene monoklonalnih protutijela za liječenje novotvorina, autoimunih i alergijskih bolesti, od oko 30.-tak imunoglobulina i njihova derivata, samo su dva registrirana za prevenciju ili liječenje zaraznih bolesti, a uključuju palivizumab (SynagisTM) za prevenciju respiratornog sincicijskog virusa u prerano rođenih novorođenčadi i imunokompromitiranih pacijenata te za terapiju bedrenice [38,39]. No, specifična terapija monoklonalnim protutijelima protiv nekih virusa kao što su Hendra i Nipah virusi su obećavajući, kao i prema nekim drugim hemoragijskim virusima te virusima koji bi se mogli koristiti u bioterorističke svrhe [40]. Obećavajuća su i istraživanja primjene monoklonalnih protutijela na najpotentniji mikrobn toksin – botulin-toksin (BoNT) čija srednja medijan letalna doza (HLC₅₀) za čovjeka iznosi 1 ng/kg težine. Dosadašnja terapija uključuje primjenu konjskih ili limitirajućih ljudskih poliklonalnih protutijela, uz simptomatsku terapiju [41] te je potreba za sigurno i učinkovito protu-BoNT monoklonalno protutijelo [38].

Povijesno relativno stara je i primjena litičkih bakteriofaga, bakterijskih virusa u liječenju bakterijskih infekcija najčešće kože. Kao tipična patogen-specifična terapija, začudno nije široko rasprostranjena iako ima pozitivne strane, posebice specifičnost prema patogenu, netoksičnost i relativno sporo razvijanje otpornosti tijekom konzekutivne terapije [42]. Smatra se da bakteriofagni biom u prirodi nadilazi broj bakterijskih vrsta te daje nadu u pronalazak i litičkih virusa prema najotpornijim bolničkim bakterijskim sojevima. No, u novije vrijeme se sve više znanstvene pažnje daje bakteriofagnim lizinima, endolizinima ili specifičnim peptidoglikanskim hidrolazama kao novom klasom enzibiotika. Veliki je broj izoliranih lizina koji djeluju i na gram-pozitivne uzročnike s visokom otpornošću na antibiotike no manje je izraženo djelovanje na gram-negativne vrste. Osim što su široko rasprostranjeni u prirodi, sve više se kemijski moduliraju te su prisutni u obliku kimernih lizina (kimeolizini) i sintetskih lizina nazvanih artilizini. Dok većina lizina izoliranih iz prirode djeluje mikrobicidno egzogenim putem na gram-pozitivne uzročnike (enterokoki, stafilokoki, *Streptococcus pyogenes* i dr.), artilizini mogu djelovati baktericidno unutar

stanice, ali i na gram-negativne bakterijske vrste (npr. na *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida*, *Yersinia* spp., *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) [43].

No, izuzev iskustva u patogen-specifičnoj terapiji putem monoklonalnih protutijela ili prevenciji putem aktivne imunizacije ili primjene bakteriofaga ili bakteriofagnih lizina, kimeolizina i artilizina, postavlja se pitanje koja su to tzv. alternativna rješenja¹⁶ koja mogu pomoći globalnom pozivu za pronalaskom novih antibiotika? Jedno od rješenja je i promišljanje da nam antibiotici kao molekule koji djeluju direktno na mikrobe, uplićući se u njihov metabolizam, kao takvi ne trebaju. No, kako osmisliti rješenja u najgorem scenariju? Kako reagirati ako na vidiku nema novih antibiotika? Jedno od znanstvenih pristupa koji se uvelike proučavaju jest primjena biološki aktivnih molekula koje smanjuju virulenciju etiološkog uzročnika ili djeluju alternativno u odnosu na dobro poznate antibiotike. Dakle, dosadašnji tradicionalni probir molekula koji je imao za cilj od živog mikroba učiniti uginuli mikrob [44] je usmjeren u novi pristup. Iako smo svjedoci registracije novih djelatnih tvar unutar poznatih skupina antibiotika, npr. tigeciklina kao glicilciklinske klase, telitromicina unutar ketolidne skupine, daptomicina unutar lipopetida, moksifloksacina i gatifloksacina kao kinolona te linezolida kao oksazolidinona i kvinupristina/dalfopristin kombinacije streptograminske skupine antibiotika, puno je veća skupina biološki aktivnih molekula koje se istražuju kao potencijalni inhibitori mikrobne virulencije ili im je mehanizam baktericidnog učinka posvema drugačiji od do sada poznatih.

Tako da je učinak inhibitora mikrobne virulencije primijećen i *in vivo*, kao što je to bio slučaj s inhibitorima aspartil-proteaza (Sap) tijekom HAART terapije infekcije HIV-om. Naime, ovi Sap-proteaza inhibitori ujedno su inhibirali i hidrolitičke enzime i kandida, smanjujući time pobol od oportunističkih infekcija uzrokovanih vrstama roda *Candida*. Stoga je pronalazak novih Sap-inhibitora izuzetno važno ne samo kao alternativna terapija kandidoza (i drugih mikroba kojim je ova klasa proteinaza virulentni čimbenik), već i pri liječenju HIV-a [45]. No, unutar ovih hidrolitičkih enzima, izgled da postoji velike razlike u ulozi tijekom mikrobne patogeneze, pa tako Sap1, Sap2 i Sap3 imaju značajniju ulogu u mikoza epitelu i kože, dok su Sap4, Sap5, Sap6 značajniji kod sistemskih mikoza što ukazuje na mogućnost pronalaska inhibitora koji će ciljano sprječavati razvoj mikoza. Osim toga inhibitori drugih klasa enzima, npr. fosfolipaza također pokazuju

učinke *in vitro* i *in vivo* kao što je to aleksidin dihidroklorid. Modulatori lipidnih signalnih molekula, inozitol-fosforil-ceramid sintaze (IPC1) su također značajne molekule (kao npr. aurebazidin A i khafrefungin) u alternativnom pristupu antimikotika. Nadalje, veliki broj niskomolekularnih tvari pokazuje i inhibiciju polimorfizma, značajnog virulentnog čimbenika u vrste *Candida albicans* i *C. dubliniensis* [46]. Nadalje, inhibicija tvorbe bioflma je značajna zbog infekcija abiotičkih katetera i usadaka te su istraživanja usmjerena u molekule koje nisu antibiotici, a i koje se mogu ugraditi u same katetere s ciljem inhibicije adhezencije mikroba. Jedan od primjera je i istraživanje Silesa i sur. [47] na bazi od 1200 spojeva koje su djelatne tvari registrirane ispred američkog FDA, a koje nisu indicirani za gljivične infekcije.

No, problem postaje sve veći, što je jasno i putem sredstva javnog priopćavanja (televizija, novine, web, e-mediji) te posljedično tomu usmjerava pitanja koja su etičke naravi s moralnim odlukama.

Etička pitanja i moralne dvojbe

Lundborh i Tamhankar [48] smatraju da postavljajući pitanja možemo promijeniti ponašanje koje će dovesti do npr. smanjenja potrošnje antibiotika ili racionalizacije propisivanja te promjene u stavovima zdravstvenih djelatnika (onih koji propisuju) i korisnika (pacijenata). Takvo propitivanje, ali unutar svih dionika koji sudjeluju u rješavanju problema otpornosti mikroba na antibiotike je nužno dovesti i u javnu domenu. Problem otpornosti mikroba na antibiotike se može postaviti i u kulturološki kontekst kojeg označavaju brojni i katkad kaotični čimbenici koji utječu na odluku o primjeni ili ne-primjeni antibiotika, a mogu se definirati na makro i mikro nivou ili razini [48]. Neki od makro razine su preporuke za kliničare, utjecaj farmaceutskih tvrtki, stupanj edukacije, izvori informacija o antibioticima, legislativa i pravila propisivanja lijekova i drugi. Čimbenici na mikro razini uključuju sve one koje ima zdravstveno osoblje na profesionalnom nivou, od znanja, vještina i samo-percepcije, stupnja cjeloživotnog učenja do doživljaja pacijenata. Osim već spomenutog globalnog značaja otpornosti mikroba s kojim smo svi suočeni, razna politička i filozofska pitanja proizlaze iz problema. No, problem otpornosti mikroba na antibiotike rađa sve više etičkih pitanja i moralnih dvojbi. Littmann i sur. [49] propituju te etičke odluke koje moramo donijeti u svezi globalnog problema otpornosti mikroba na antibiotike. Moralna je obaveza sačuvati učinkovitost antibioti-

¹⁶ pod alternativnim rješenjima unutar diskursa pristupa antimikrobnog liječenja podrazumijevaju se one biološki aktivne tvari koje ne ispoljavaju direktan antimikrobni učinak ili im je učinak potencirajući na već postojeće antimikrobne lijekove. Dakle, mehanizam antimikrobnog učinka nije direktno povezan s već poznatim mehanizmima mikrobicidnog djelovanja, a uključuju vrlo široku paletu tvari, heterogenog kemijskog sastava, ali i mikrobiote i zajednice mikrobiota ili njihove produkte. Neke od njih inhibiraju virulentne čimbenike ili moduliraju imunološki odgovor nositelja nazivajući se lomiteljima otpornosti mikroba (Brown D, *Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?*, Nat Rev Drug Discov 2015; 14: 821–32.)

ka za nadolazeće generacije, no postavlja se pitanje kako, s kojim rizicima (i tko će ih preuzeti), kako i koga kazniti s ciljem čuvanja učinkovitosti antibiotika, tko će i kako prihvatiti rizike otpornosti i kako ćemo uspostaviti konsenzus oko prioriteta i nadolazećih akcija. Dakle, koje su to vrijednosti najvažnije (prioritetne) unutar savladavanja problema otpornosti mikroba te da li smo solidarni s načinom provođenja mjera. Ako je problem otpornosti mikroba na antibiotike globalan, postavljaju se i etička pitanja kolektivnog odlučivanja i prihvaćanja legalnih učinaka takvih odluka. Littmann i sur. [49] naglašavaju da osvještavanje rizika otpornosti na antibiotike su važni radi utvrđivanja prioriteta odluka koja moraju biti solidarna i u koju moraju biti uključeni svi dionici, dakle od zdravstvenih djelatnika, pacijenata, institucija, farmaceutskih i *biotech* tvrtki te javnih i privatnih fondova, novinstva i dr.

Međutim, često se zanemaruju etička pitanja unutar problema mikrobne otpornosti, a veća pozornost se daje tehničkim pitanjima, gdje odgovori stižu u vidu vođenja statistike otpornosti mikroba na pojedinim kemoterapeutima, poboljšavaju se dijagnostičke mjere s ciljem brže i ciljane terapije, objavljuju se algoritmi i smjernice liječenja pojedinih organskih sustava ili s obzirom na osjetljivost mikrobnih izolata te se optimizira propisivanje putem načina registracije antimikrobnih lijekova (npr. generički lijekovi s nižom cijenom). Nepostavljanje etičkih pitanja i donošenja odluka ima posljedice na individualnom i širem društvenom nivou. Naime, nedostatan je odgovorno i restriktivno propisivanje antibiotika, već je problem puno širi te se i kao takav mora sagledati i u širem kontekstu, sistemski [50].

Ako smatramo da je otpornost mikroba na antibiotike jedna od najvećih prijetnji na ljudsko zdravlje u XXI. stoljeću, a uvidjevši da je nadolazeća budućnost neizvjesna (nema novih antibiotika, raste otpornost mikroba) na koji način djelovati na taj izazov? Koji su prioriteti?

Primjer suočavanja s prioritetima opisuju Llor i Bjerrum [51] na primjeru prekomjerne i neracionalne upotrebe antibiotika kod respiratornih infekcija te postavljaju pitanja o mehanizmima upravljanja problemom, ulogama smjernica liječenja, ulozi okoline i odnosa liječnik-pacijent te socijalno-kulturološke aspekte koji utječu na nepotrebno i neracionalno propisivanje antibiotika kada to nije indicirano, recimo spomenute respiratorne infekcije koje su u većini slučajeva virusne etiologije. Autori također stavljaju u kontekst ekonomsku razvijenost pojedine države koja se ogleda i u brzim dijagnostičkim mjerama koja u primarnoj zdravstvenoj zaštiti mogu utjecati na racionalno propisivanje antibiotika. Naime, infekcije urinarnog sustava, pogotovo u žena su učestale te s ciljem smanjenja empirijskog pristupa i brže i ciljane kauzalne terapije u ordi-

nacijama obiteljskih liječnika, u nekim zemljama su brze metode *point-of-care* testova za postavljanje dijagnoze cistitisa uz antibiogram (kao što je to npr. Flexicult™)¹⁷, ili primjena brzih testova za dokaz antigena BHSA u obrisku tonzila, koji će uz CRP površinske krvi dati smjernice za kauzalnu terapiju tonzilofaringitisa, poglavito u pedijatriji.

Kulturološke razlike u percepciji korištenja antibiotika unutar Europe su velike. Primjer za to je odgađanje primjene propisanog antibiotika u pacijenata u Velikoj Britaniji i Norveškoj. Pacijenti sami, na osnovu praćenja razvijanja simptoma odlučuju da li će koristiti antibiotike ili ne, koji je već propisan. Time je pacijent ujedno i aktivni sudionik unutar terapijskog procesa. S druge strane, ne-primjena antibiotika smanjuje i nus-pojave vezane za terapiju, a studije govore da je ovakav oblik suradljivosti pacijenta uspješan kod sinusitisa i upale srednjeg uha u Norveškoj [52].

Etička pitanja uključuju i javnozdravstvene posljedice svjesne ignorancije kemijske kontaminacije okoliša s antibioticima i njihovim metabolitima koji dolaze u okoliš biotransformirani i izlučeni pogotovo u slivnim vodama, kanalizaciji, rijekama, gnoju i oko uzgajališta životinja za prehranu ljudi kao i oko tvornica za proizvodnju antibiotika i bolnica [54–56]. Naime, poznato je da antibiotici i u sub-MIK koncentracijama ispoljavaju određene biološke učinke na mikrobiote kao i njihovi metaboliti [57], no mi do sada ne poznajemo učinke na ekološki sustav i širi sistemski učinak tog fenomena. Dakle, iako ne poznajemo učinke rezidua, to nije zanemariva činjenica već traži znanstvenu pažnju posebice što je utvrđena povezanost između rezidua antibiotika u okolišu, otpornih klonova mikroba te prijenosa infekcija na čovjeka [58].

Također valja naglasiti i nedovoljno sankcioniranje crnog tržišta antibioticima kao i upitnu ulogu Interneta. Uz to, problem je i etička strana banaliziranja problema kojeg ne doživljavamo trenutačno ozbiljnim, kao na primjer neracionalna upotreba biocida i prisutnost biocida u velikom broju proizvoda koje svakodnevno koristimo (npr. kozmetičkim i za osobnu njegu). Postavljanje etičkih pitanja rađa i težnju za postavljanjem prioriteta odluka imajući u vidu da svaka intervencija ima drugačiju ciljnu skupinu. Tako na primjer i znanstvena zajednica daje odgovore na ova pitanja, aktivno sudjelujući u rješenjima sveprisutne otpornosti mikroba na antibiotike. Promjena paradigme u znanstvenim istraživanjima je odgovor i na krizu ulaganja u istraživanja te je ujedno i etičko pitanje za sve nas da li možemo podijeliti rizik javnog ulaganja u ta istraživanja, a ne da optužujemo farmaceutsku industriju i *biotech* tvrtke kako ne istražuju dovoljno? Ako znamo da postoji ko-

¹⁷ Flexicult™ uključuje *in vitro* test za brzo određivanje broja mikroba u jedinici volumena urina nakon preljevanja urina, ali i osjetljivost izolata na trimetoprim, nitrofurantoin amoksilav/klavulanska kis., ciprofloksacin te cefalotin.

relacija između potrošnje antibiotika i otpornosti na te antibiotike, etičko je pitanje koje ćemo antibiotike ukloniti iz šire upotrebe, koje mjere kazne ćemo provoditi i tko će se nositi s mogućim rizicima takvih odluka? Naime, samo ne-

ka od ovih pitanja govore da trebamo imati i osjećaj za socijalni, politički i ekonomski kontekst u kojemu je otpornost mikroba na antibiotike globalni problem i s kojim smo svi suočeni [49].

Tablica 1. Prikaz nekih od alternativnih pristupa antimikrobne terapije s dokazanim učincima *in vitro/in vivo* (preuzeto i prilagođeno iz 37, 64–66)

Table 1. Some alternative approaches to antimicrobial therapy with detected *in vitro/in vivo* pathogens (adapted from ref. 37, 64–66)

Pristup	Primjeri	Djelatne tvari
kolonizacija s intencijom	transplantacija mikrobioma uslijed PMK*	mikrobiom osobe u eubiozi
	asimptomatska infekcija nosnog vestibuluma (kolonizacija s MRSA)	kolonizacija sa <i>S. epidermidis</i> Esp+ (serin-proteinaza pozitivan)
	infekcija s BHSA** tonzila	kolonizacija s <i>Streptococcus salivarius</i> K12 (bakteriocin)
	primjena živih probiotičkih sojeva uslijed PMK	kolonizacija s <i>Lactobacillus</i> spp. (genetski i fenotipski definiranih)
	disbioza mikrobioma GIS uslijed infekcije s nekim enterovirusima	kolonizacija s <i>Lactobacillus</i> spp. (genetski i fenotipski definiranih)
inhibicija mikrobne virulencije	inhibitori QS-molekula: LuxR homologe vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	strukturni analozi AHL-a-npr. halogenirani furanoni
	inhibitori QS molekula: vrsta <i>Staphylococcus aureus</i> AgrC	inhibitroni autoinducirajući peptidi (AIP)
	inhibitori adhezije/blokatori receptora	pilicidi, kurlicidi
	inhibitori tvorbe biofilma putem modulacije N-acil homosetin laktona (AHL) u gram-negativnih bakterija ili autoinducirajućih peptida, autoinduktora-2, c-di-GMP, indol-signalni putevi i dr.	razne niskomolekularne tvari, prirodne i sintetske
	inhibitori tvorbe biofilma vrsta roda <i>Candida</i>	veliki broj prirodnih molekula; ciklosporin, geldanamacin
	inhibitori sekrecijskog sustava tipa 3. (T3SS)	acilirani hidrazoni, aurodoz, minozid, gvadnomini
	inhibitori efluks-pumpi	npr. ABEPI1 i ABEPI2 minociklinske pumpe u vrste <i>Acinetobacter baumannii</i>
	inhibitori Sap-proteinaza	pepstatin A, sakvinavir, indinavir, protutijela i dr.
inhibitori polimorfizma vrsta roda <i>Candida</i>	brojne molekule (polifenoli) kao i antimikotici u sub-MIK koncentracijama	
antimikrobni peptidi	endogeni ili sintetski peptidi s dokaznim antimikrobnim učinkom	omiganan, peksiganan, talaktoferin, lantibiotici, plektasin
bakteriofagi	litički živi fagi	brojni
bakteriofagni lizini	kimeolizini	ClyS, Lys 168-87, ClyH, PRF-119 i dr.
	artilizini	P128, P16-17, CLL, Cla, pesticinu-slični, LoGT serija i dr.
modifikacija funkcije toksina	inhibicija letalnog čimbenika (PA) vrste <i>Bacillus anthracis</i>	cisplatin, heksa-D-arginin
modulacija ekspresije virulencije	modulacija <i>Vibrio cholerae</i> ToxT	virstatin
modulacija adhezije	pilin kaperon (npr. PapD kod uropatogenih patovar <i>E. coli</i>)	pilicidi: biciklički 2-piridoni i N-supstituirajući derivati amino-kiselina
modulacija autofagije	induktori autofagije	rapamicin, metformin, izonijazid, verapamil, statini, litij, vitamini D3, C i E i dr.

Legenda: PMK = pseudo-membranozni kolitis uzrokovan *Clostridium difficile*

Umjesto zaključka

Nadovezujući se na stavove Viensa [59] da je otpornost mikroba na antibiotike sporo razvijajuća i progresivna nepogoda koja je javnozdravstveni problem, rješenjima te krize bi trebalo pristupiti sistemski, uključiti sve dionike koji imaju posredan i neposredan utjecaj na antibiotike. Naime, ako priznamo da se problem otpornosti mikroba na antibiotike pogoršava, koji su to koraci, etička pitanja i moralne dvojbe kojima strateški možemo solidarno pristupiti ovom problemu? Koji su to koraci koje ćemo na tom putu učiniti? Dosadašnje saznanje govori da je problem otpornosti mikroba puno širi nego što smo do sada mislili te uključuje promjene ponašanja ne samo na individualnom nivou već i socijalnom, kulturološkom i političkom. Znanstvena zajednica je od samog osvita široke kliničke primjene antibiotika bila upoznata s otpornošću mikroba već 40.-tih godina prošlog stoljeća [60]. Iako suočena s tom činjenicom, zlatno doba antimikrobne terapije je započelo s otkrićima prirodnih antibiotika te biosintetskih i sintetskih antimikrobnih lijekova u 50.-tim i 60.-tim godinama prošlog stoljeća [61]. Napuštanjem prvotnog doba antimikrobne terapije, ujedno i mikrobno-specifične s heterolognim protutijelima iz seruma konja, ulazimo u drugo i najduže doba antimikrobne terapije usmjereno ka razvoju antimikrobnih tvari, kemijski definiranih s potvrdom ocjenom kakvoće (učinkovitosti i sigurnosti primjene). No, tijekom drugog doba antimikrobne terapije, uslijed velikog broja čimbenika dolazi do pojave kolateralnih žrtava takvog pristupa, do pojave mikroba otpornih na postojeću terapiju. Stoga težnja znanstvene zajednice vođena i javnim pritiskom na tu krizu jest pronaći modalitete rješenja. Jedno od rješenja je primjena paradigme [62] u smislu mikrobno-specifične terapije putem monoklonalnih protutijela, dok je druga struja istraživanja usmjerena na alternativne pristupe u terapiji primjenom inhibitora mikrobne virulencije kemijski definiranih tvari kao što su antimikrobni peptidi, bakteriofagi ili lizini te primjena drugih mikrobiota ili cijelog mikrobioma [63]. Iako se kriza otpornosti mikroba na antibiotike definira kao spororastuća, ali progresivna javnozdravstvena nepogoda, znanstvena zajednica kao jedan od dionika težnje za smanjenjem problema i posljedica čini da Pandorina kutija nikada nije zatvorena.

(Neki od alternativnih pristupa navedenih u tekstu prikazani su u Tablici 1.)

Literatura

- [1] Kuhn T.S., The Structure of Scientific Revolutions, International Encyclopedia of Unified Science 2nd Ed, 1970, Chicago, str. 77.
- [2] WHO, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>
- [3] WHO, EUR/RC61/14 European strategic action plan on antibiotic resistance, http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf?ua=1
- [4] Anonimno, <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>
- [5] European Parliament and of the Council, Decision no 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council of 24 september 1998 setting up a network for the epidemiological surveillance and control of communicable diseases in the community, Official Journal L 268, 03.10.1998, str 1–7.
- [6] European Parliament and of the Council, Regulation (EC) no 851/2004 of the European Parliament and of the Council of 21 April 2004 establishing a European centre for disease prevention and control, Official Journal L 142/1, 30.4.2004., str 1–11.
- [7] Parra M, Liu X, Derrick SC, et al. Co-expression of Interleukin-15 Enhances the Protective Immune Responses Induced by Immunization with a Murine Malaria MVA-Based Vaccine Encoding the Circumsporozoite Protein. *Rénia L, ed. PLoS ONE.* 2015; 10: e014114.
- [8] Wells TNC, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Malaria medicines: a glass half full?, *Nature Rev-Drug Discov* 2015; 14: 424–442
- [9] European Medicines Agency, www.ema.europa.eu
- [10] Casadevall A. Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm? *Clin Infect Dis* 1996; 23: 790–4.
- [11] Lachmann P, Anti-infective antibodies-reviving and old paradigm. *Vaccine* 2009; 275: 33–37.
- [12] Nett M, Ikeda H, Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Reports* 2009; 26: 1362–1384.
- [13] Procópio RE, Silva IR, Kassawara Martins M, de Azevedo JL, de Araújo JM, Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis* 2012; 16: 466–471
- [14] Högberg LD, Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31: 509–15.
- [15] Lee C-R, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 4274–4305.
- [16] Marra A, Antibacterial resistance: is there a way out of the woods? *Future Microbiol* 2011; 6: 707–9
- [17] Vasoo S, Cunningham SA, Cole NC, Kohner PC, Menon SR, Krause KM, Harris KA, De PP, Koh TH, Patel R, In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam, Aztreonam-Avibactam, and a Panel of Older and Contemporary Antimicrobial Agents against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 7842–6.
- [18] Brown D, Antibiotic resistance breakers – can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nature Rev-Drug Discovery* 2015; 14: 821–832.
- [19] Jain R., Chen D., White R. J., Patel D. V., Yuan Z, Bacterial peptide deformylase inhibitors: A new class of antibacterial agents. *Curr Med Chem* 2005; 12: 1607 – 1621
- [20] Peyrusson F, Butler D, Tulkens PM, Van Bambeke F. Cellular Pharmacokinetics and Intracellular Activity of the Novel Peptide Deformylase Inhibitor GSK1322322 against *Staphylococcus aureus* Laboratory and Clinical Strains with Various Resistance

- Phenotypes: Studies with Human THP-1 Monocytes and J774 Murine Macrophages. *Antimicrob Agents Chemoth* 2015; 59: 5747–5760.
- [21] Fu H, Karlsson J, Bylund J, Movitz C, Karlsson A, Dahlgren C. Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 247–56.
- [22] Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 348–50.
- [23] Ekins S, Mestres J, Testa B. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *British J Pharmacol* 2007; 152: 21–37.
- [24] Shanmugham B, Pan A. Identification and Characterization of Potential Therapeutic Candidates in Emerging Human Pathogen *Mycobacterium abscessus*: A Novel Hierarchical *In Silico* Approach. Herrmann JL, ed. *PLoS ONE*. 2013; 8: e59126..
- [25] Hu Y, Shamaei-Tousi A, Liu Y, Coates A, A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections, *PLoS One*. 2010; 27: e11818
- [26] Coates ARM, Hu Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Brit J Pharmacol* 2007; 152: 1147–1154.
- [27] European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium, EMA/HMPC/573462/2009 Rev.1, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/07/WC500108750.pdf
- [28] Chu M, Ding R, Chu Z, et al. Role of berberine in anti-bacterial as a high-affinity LPS antagonist binding to TLR4/MD-2 receptor. *BMC Complement Alter Medicine*. 2014; 14: 89.
- [29] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 564–582.
- [30] Winzeler EA, Manary MJ. Drug resistance genomics of the anti-malarial drug artemisinin. *Genome Biology*. 2014; 15: 544.
- [31] Smith AW, Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 1539–50.
- [32] Skabytska Y, Biedermann T, *Staphylococcus epidermidis* sets things right again, *J Invest Dermatol* 2016; 136: 559–560.
- [33] Spellberg B, Daum R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Sem Immunopathol* 2012; 34: 335–348.
- [34] Middleton JR, *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Edpr Rev Vaccines* 2008; 7: 805–815
- [35] Martínez MJ, Salim AM, Hurtado JC, Kilgore PE. Ebola Virus Infection: Overview and Update on Prevention and Treatment. *Infect Dis Therapy* 2015; 4: 365–390.
- [36] Chow S-K, Casadevall A. Monoclonal Antibodies and Toxins-A Perspective on Function and Isotype. *Toxins* 2012; 4: 430–454.
- [37] Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, Foster S, Gilmore BF, Hancock RE, Harper D, Henderson IR, Hilpert K, Jones BV, Kadioglu A, Knowles D, Ólafsdóttir S, Payne D, Projan S, Shaunak S, Silverman J, Thomas CM, Trust TJ, Warn P, Rex JH. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 239–51.
- [38] Diamant E, Torgeman A, Ozeri E, Zichel R. Monoclonal Antibody Combinations that Present Synergistic Neutralizing Activity: A Platform for Next-Generation Anti-Toxin Drugs. *Maghazachi AA*, ed. *Toxins*. 2015; 7: 1854–1881.
- [39] Fox J.L. Anthrax drug first antibacterial mAb to win approval. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 8.
- [40] Zhu Z, Dimitrov AS, Chakraborti S, Dimitrova D, Xiao X, Broder CC, Dimitrov DS., Development of human monoclonal antibodies against diseases caused by emerging and biodefense-related viruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006; 4: 57–66
- [41] Dembek Z.F., Smith L.A., Rusnak J.M. Botulism: Cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. *Disaster Med. Public Health Prep*. 2007; 1: 122–134
- [42] De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit M-A. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4: 39.
- [43] Yang H, Yu J, Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol* 2014; 5: 542.
- [44] Monaghan RL, Barrett JF. Antibacterial drug discovery—then, now and the genomics future. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 901–9.
- [45] Dos Santos ALS. HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans* André Luis Souza dos Santos. *World J Biological Chem*. 2010; 1: 21–30.
- [46] Gauwerky K, Borelli C, Korting HC., Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today*. 2009; 14: 214–22.
- [47] Siles SA, Srinivasan A, Pierce CG, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. High-Throughput Screening of a Collection of Known Pharmacologically Active Small Compounds for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3681–3687.
- [48] Lundborg SC, Tamhankar AJ. Understanding and changing human behaviour – antibiotic mainstreaming as an approach to facilitate modification of provider and consumer behaviour. *Upsala J Med Sci*. 2014; 119: 125–133.
- [49] Littmann J, The ethical significance of antimicrobial resistance, *Pub Health Ethics* 8; 2015: 209–224.
- [50] Leibovici L, Paul M, Ezra O, Ethical dilemmas in antibiotic treatment. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 12–16.
- [51] Llor C, Bjerrum L. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf* 2014; 5: 229–41.
- [52] Høyse S, Gjelstad S, Lindbæk M, Effects on antibiotic dispensing rates of interventions to promote delayed prescribing for respiratory tract infections in primary care, *Br J Gen Pract*. 2013; 63: e777–e786.
- [53] Groot MJ, van't Hooft KE. The Hidden Effects of Dairy Farming on Public and Environmental Health in the Netherlands, India, Ethiopia, and Uganda, Considering the Use of Antibiotics and Other Agro-chemicals. *Front Public Health*. 2016; 12: 1–9
- [54] Verwer C, Smolders G, van de Vijver L, van Eekeren N, Hospers M, van der Marel A. Antibiotica in grond en water. *Veefocus* 2013; 27: 34–5.
- [55] O'Neill J. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste; the Review on Antimicrobial Resistance (2015). Available from: <http://amr-review.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf>

- [56] Wright GD, Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13: 589–594
- [57] Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala J Med Sci.* 2014;119:103–107.
- [58] Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL, A review of antibiotic use in food animals; perspective, policy, and potential, *Publ Health Rep* 2012; 127: 4–22.
- [59] Viens AM, Littmann J, Is Antimicrobial Resistance a Slowly Emerging Disaster? *Public Health Ethics.* 2015; 8: 255–265.
- [60] Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Royal Soc Exper Biol Med* 1942; 51: 386–389
- [61] Walsh C, Where will new antibiotics come from? *Natur Rev-Microbiol* 2003; 1: 65–70
- [62] Rolain JM, Canton R, Cornaglia G. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 615–6.
- [63] Allen RC, Popat R, Diggle SP, Brown SP. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12: 300–8.
- [64] Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol.* 2007; 3: 541–8.
- [65] Beckham KS, Roe AJ. From screen to target: insights and approaches for the development of anti-virulence compounds. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 139.
- [66] Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv.* 2013; 31: 224–4