

Lijekovi i metode

Drugs and procedures

PRIKAZ RIJETKO VIĐENOG OBLIKA OTPORNOSTI NA KARBAPENEME U VRSTE *ENTEROBACTER CLOACAE*

A REPORT OF RARELY OBSERVED RESISTANCE PATTERN TO CARBAPENEMS IN A CLINICAL ISOLATE OF *ENTEROBACTER CLOACAE*

DANIJELA BEJUK, MLADEN NOVKOŠKI, VLADO JURANKO, DAVORKA PRAJDIĆ-PREDRIJEVAC,
NIVES TODORIĆ, IVANA MIKAČIĆ, MARIJA GUŽVINEC, ARJANA TAMBIĆ ANDRAŠEVIĆ*

Deskriptori: *Enterobacter cloacae* – izolacija, enzimologija, djelovanje lijeka; Enterobakterijske infekcije – mikrobiologija, farmakoterapija; Karbapenemi – farmakologija, terapijska primjena; Beta-laktamaze – genetika, metabolizam; Otpornost na beta-laktamske antibiotike

Sažetak. Rad izvještava o pojavi soja *Enterobacter cloacae* u kojeg je dokazan rijetko viđen oblik otpornosti na karbapeneme posredovan enzimom IMI-1, skupine A beta-laktamaza. Soj je izoliran iz obriska rane u bolesnika koji je zbog infekcije kirurške rane prethodno liječen meropenemom. Ograničen izbor antibiotika kojima se mogu liječiti infekcije uzrokovane ovakvim uzročnicima upućuje na nužnost točne identifikacije višestruko otpornih gram-negativnih mikroorganizama i otkrivanje njihovih mehanizama otpornosti. Prepoznavanje višestruko otpornih mikroorganizama naglašava važnost kontinuiranoga mikrobiološkog nadzora bolesnika, osobito u jedinicama intenzivnog liječenja. U prikazanoj ustanovi nije bilo sekundarnog širenja ovog soja. Identifikacija novih mehanizama otpornosti pomaže kliničarima u izboru ciljane terapije, a istodobno je nužna za uspješno sprječavanje širenja infekcija izazvanih višestruko otpornim mikroorganizmima.

Descriptors: *Enterobacter cloacae* – isolation and purification, enzymology, drug effects; Enterobacteriaceae infections – microbiology, drug therapy; Carbapenems – pharmacology, therapeutic use; Beta-lactamases – genetics, metabolism; Beta-lactam resistance

Summary. The paper reports on the emergence of strain in which *Enterobacter cloacae* has demonstrated an unusual form of resistance to carbapenems mediated by enzyme IMI-1, class A beta-lactamase. The strain was isolated from a wound swab in the patient who had a surgical wound infection previously treated with meropenem. Limited choice of antibiotics that can treat infections caused by these pathogens indicates the necessity of accurate identification of multiple resistant gram-negative microorganisms and mechanisms of their resistance. Recognition of multiresistant gram-negative microorganisms emphasizes the importance of continuous microbiological monitoring of patients, especially in intensive care units. In the investigated institution there was no secondary spread of this strain. Identifying new mechanisms of resistance will be helpful to clinicians in selection of targeted therapy, while important for efficient prevention of spreading infections caused by multiple resistant microorganisms.

Liječ Vjesn 2013;135:316–321

Enterobakterije pa tako i rod *Enterobacter*, a posebno vrste *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter aerogenes* važni su uzročnici infekcija iz zajednice i teških bolničkih infekcija kao što su infekcije mokraćnog sustava povezane s kateterom, pneumonije, infekcije kože i potkožnog tkiva, intraabdominalne infekcije i bakteriemije.^{1,2} Liječenje infekcija uzrokovanih vrstama *Enterobacter* spp. pravi su izazov zbog prirođenih i stečenih mehanizama otpornosti na peniciline, cefalosporine, aminoglikozide i fluorokinolone, a izbor učinkovite terapije dodatno se komplicira pojavljivanjem otpornosti i na karbapeneme. Ovaj rad opisuje prvi slučaj otpornosti na karbapeneme u vrsti *Enterobacter cloacae* određen beta-laktamazom IMI-1, do sada nezabilježen u Hrvatskoj. Cilj nam je upozoriti na pojavu karbapenemaza među vrstama porodice *Enterobacteriaceae*, čija prisutnost u odsutnosti drugih mehanizama otpornosti ne uzrokuje nužno visoku otpornost na karbapeneme, već samo smanjenu ili katkad neznatno smanjenu osjetljivost, što otežava njihovu fenotipsku identifikaciju sa svim kliničkim posljedicama.^{3,4} Kako se prisutnost karbapenemaza ne može jednostavno odrediti očitavanjem rutinskih testova osjetljivosti koji čine osnovu rada kliničkih mikrobioloških laboratorija,

to naglašavamo važnost dodatnih fenotipskih testova kako bismo precizno odredili sve brojnije mehanizme otpornosti.⁵⁻⁷

Prikaz bolesnika

Muškarac u dobi od 68 godina zaprimljen je u Magdale-
nu – kliniku za kardiovaskularne bolesti u studenome 2010.

* **Zavod za kliničku mikrobiologiju i hospitalne infekcije, KB »Sveti Duh«** (prim. dr. sc. Danijela Bejuk, dr. med.), **Odjel za kliničku farmakologiju i toksikologiju, Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KB »Sveti Duh«** (Ivana Mikačić, dr. med.), **Odjel za kardiovaskularnu kirurgiju, Magdalena – klinika za kardiovaskularne bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku** (dr. sc. Mladen Novkoski, dr. med.; Vlado Juranko, dr. med.; mr. sc. Davorka Prajdić-Predrijevac, dr. med.; Nives Todorčić, dr. med.), **Zavod za kliničku mikrobiologiju, Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević« Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Referentni centar Ministarstva zdravlja za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike** (Marija Gužvinec, dipl. ing. biol.; prof. dr. sc. Arjana Tambić Andrašević, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prim. dr. sc. D. Bejuk, Zavod za kliničku mikrobiologiju i hospitalne infekcije, Klinička bolnica »Sveti Duh«, Sveti Duh 64, 10000 Zagreb, e-mail: dbejuk@kbsd.hr

Primljeno 22. rujna 2012., prihvaćeno 14. listopada 2013.

godine, zbog potrebe invazivne kardiološke obrade. U bolesnika je izražen opsežan morbiditet s nekoliko prisutnih rizičnih čimbenika kardiovaskularne bolesti. U dva navrata prebolio je moždani udar bez znatnih posljedica. Prije deset godina prebolio je infarkt miokarda te je podvrgnut proceduri ostavljanja proširnice (stenta) u prednju lijevu silaznu koronarnu arteriju. Prije godinu dana zbog klaudikacija u lijevoj nozi angiološki je obrađen te je indicirano i učinjeno femoropoplitealno premoštenje na lijevoj nozi. U istom razdoblju pojačavaju se anginozne tegobe te je zbog prisutnosti rizičnih čimbenika indicirana invazivna kardiološka obrada. Bolesnik više godina liječi arterijsku hipertenziju, šećernu bolest koja je regulirana oralnim hipoglikemicima te hiperlipoproteinemiju. Drugi postproceduralni dan nastupila je ishemija desne noge te je u prvom aktu učinjena tromboektomija po Fogartyju. Kako u sljedećih šest sati perzistiraju znakovi ugroženosti, učinjena je angiografija donjih ekstremiteta te se indicira desnostrano ilijakofemoralno premoštenje. Unutar 24 sata učinjeno je i femoropoplitealno premoštenje na desnoj nozi. U sljedećih 12 sati razvio se »compartment« sindrom te je učinjena opsežna fasciotomija mišića potkoljenice. Zbog prisutne upalne reakcije i nekroze mišića potkoljenice te masivnoga sistemskog upalnog odgovora, a s obzirom na prisutnost žilnih umetaka, u terapiju su uvedeni meropenem i vankomicin. Terapija meropenemom i vankomicinom prekinuta je dvanaestoga postoperativnog dana zbog izolacije *Enterobacter cloacae* koji je otporan na meropenem. Kako se u istom uzorku izolirao i *Pseudomonas aeruginosa* otporan na karbapeneme, u terapiju se ciljano uvodi ciprofloksacin u trajanju od šesnaest dana: prvih 14 dana u dozi od 3 x 400 mg iv., a nakon toga još dva dana po 2 x 400 mg iv. Kako su se nakon pet dana terapije ciprofloksacinom u ponovljenom uzorku obriska rane i dalje izolirali *Enterobacter cloacae* i *Pseudomonas aeruginosa*, to se prethodno započetoj terapiji pridodaje i amikacin u jednokratnoj dnevnoj dozi od 250 mg iv. koja je prilagođena bubrežnoj funkciji bolesnika te se nakon deset dana dokida zajedno s ciprofloksacinom. U uzorku tkiva koji je ponovljen nakon pet dana sinergijske terapije ciprofloksacinom i amikacinom nije dokazan nijedan od prije izoliranih mikroorganizama, ali je posljedično zbog otpornosti na oba gore navedena antibiotika izoliran *Stenotrophomonas maltophilia*. Izolirani soj *Stenotrophomonas maltophilia* bio je otporan na sve testirane antibiotike uključujući i trimetoprim-sulfametoksazol, uz izuzetak ceftazidima i cefepima. To je razlog što je pacijent u nastavku liječen ceftazidimom 3 x 2 g iv.

U ponovljenim kontrolnim uzorcima pet dana nakon završetka terapije ciprofloksacinom i amikacinom uz *Stenotrophomonas maltophilia* ponovo je izoliran i identičan soj *Enterobacter cloacae*.

Kako u kliničkom statusu nisu postojali znakovi oporavka neurocirkulacijskog statusa desne potkoljenice uz znakove značajne destrukcije mišićno-tetivnog tkiva, indicira se natkoljenična amputacija koja je učinjena trideset drugoga postoperacijskog dana.

Višekratnim uzorkovanjem nijednom nije izoliran nijedan uzročnik iz hemokulture. Tijekom boravka na odjelu intenzivnog liječenja primijenjene su mjere kontaktne izolacije te nije zabilježen slučaj prijenosa rezistentnog uzročnika u materijalu drugih bolesnika istodobno liječenih u jedinici intenzivnog liječenja. Također, iste su mjere primijenjene i na odjelu vaskularne kirurgije gdje isto tako nije bilo pojave navedenog soja u drugih bolesnika.

Materijali i metode

a) Bakterijska izolacija i identifikacija

U Zavodu za kliničku mikrobiologiju i hospitalne infekcije Kliničke bolnice »Sveti Duh« krajem 2010. godine zaprimljeni su i obrađeni različiti uzorci gore spomenutog bolesnika, kao dio standardnoga mikrobiološkog nadzora koji se redovito provodi nad bolesnicima liječenim u jedinici za intenzivno liječenje Magdalene – klinike za kardiovaskularne bolesti.

Od pristiglih uzoraka izdvajamo tkivo mišića potkoljenice koje je zaprimljeno prije početka empirijske terapije meropenemom i vankomicinom u kojem mikroorganizmi nisu izolirani. Iz obriska rane uzetog nakon 10. dana liječenja izolirani su *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter cloacae* otporni na karbapeneme. Identifikacija mikroorganizama provedena je standardnim postupcima koji su bili u rutinskoj primjeni u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i hospitalne infekcije Kliničke bolnice »Sveti Duh«. U vrste *Pseudomonas aeruginosa* dokazane su metalo-beta-laktamaze E-testom (AB Biodisk Solna, Švedska), a soj *Enterobacter cloacae* nakon početne obrade prosljeđen je u Kliniku za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević« u Referentni centar za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike Ministarstva zdravlja na potvrdu i identifikaciju mehanizma otpornosti na karbapeneme.

b) Testiranje osjetljivosti na antibiotike i rezultati testiranja

Osjetljivost na antimikrobne lijekove vrste *Enterobacter cloacae* određena je disk-difuzijskim postupkom u skladu s dokumentom CLSI M100-S19 (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) na ove antibiotike: amoksicilin, piperacilin, amoksicilin/klavulansku kiselinu, ampicilin/sulbaktam, piperacilin/tazobaktam, cefazolin, cefuroksim, cefoksitin, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefoperazon, cefepim, imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol, gentamicin, amikacin, netilmicin i tobramicin.⁸ Rezultati su interpretirani ovako: soj je bio otporan na amoksicilin, piperacilin, amoksicilin/klavulansku kiselinu, ampicilin/sulbaktam, cefazolin, cefuroksim, cefoksitin, cefotaksim, ceftriakson, ceftazidim, cefoperazon, ertapenem, imipenem i meropenem. Soj je bio dobro osjetljiv na piperacilin-tazobaktam, cefepim, ciprofloksacin, gentamicin, amikacin i netilmicin. E-testom (bio Merieux, Francuska) određena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) na piperacilin/tazobaktam 16 µg/mL (S), ciprofloksacin 0,032 µg/mL (S), kolistin 0,5 µg/mL (S), ertapenem > 8 µg/mL (R), imipenem 32 µg/mL (R) i meropenem 32 µg/mL (R). Napominjemo da je otpornost na ertapenem, imipenem i meropenem određena disk-difuzijom i na osnovi MIK-a po dokumentu CLSI M100-S19, ali i prema preporukama EUCAST 1.0 (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).⁹ E-test cefepim/cefepim s klavulanskom kiselinom (AB Biodisk Solna, Švedska) za dokaz prisutnosti beta-laktamaza proširenog spektra (engl. *extended spectrum beta-lactamases*, ESBL) bio je negativan, a E-test istog proizvođača za metalo-beta-laktamaze nije se mogao očitati. Sumnja na prisutnost enzima koji hidrolizira karbapeneme postavljena je na temelju pozitivnoga modificiranog Hodgova testa.¹⁰ Hodgov test je pokazao jasno urašćivanje soja *E. coli* ATCC 25922 uz crtu testiranog soja *Enterobacter cloacae* prema disku meropenema. U Referentnom centru Ministarstva zdravlja za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike soj je testiran s

ciljem da se potvrdi prisutnost karbapenemaza i odredi pripadnost skupini A ili B, testovima sinergije dvaju diskova (engl. *double disk synergy test*, DDST). Negativnim testom sinergije između diska cefotazidima, odnosno imipenema i diska dipikolinolne kiseline, odnosno EDTA isključena je prisutnost metalo-beta-laktamaza, dok je opažena sinergija između diska boronične kiseline (Rosco Diagnostica, Danska) i diskova imipenema, meropenema i ertapenema upućivala na prisutnost karbapenemaze iz skupine A.

c) Molekularna dijagnostika

Metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) isključena je prisutnost gena koji kodira najčešću karbapenemazu skupine A, enzim KPC, te je dokazana prisutnost gena za enzim IMI upotrebom prije opisanih početnica. Određivanjem slijeda nukleotida na aparatu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, SAD) potvrđeno je da se radi o genu koji kodira enzim IMI-1.

Rasprava

Enterobakterije otporne na karbapeneme bile su tijekom 90-ih godina rijetkost, a njihova pojava bila je posljedica promjene ciljnih molekula, aktivnog izbacivanja lijeka i smanjene propusnosti stanične stijenke s pridruženim beta-laktamazama ESBL i/ili AmpC-cefalosporinazama.¹¹⁻¹⁶ Prva stečena karbapenemaza otkrivena 1990. godine u porodici *Enterobacteriaceae*, koja se razlikovala od do tada poznatih metalo-beta-laktamaza, bila je kromosomska NMC-A-karbapenemaza (engl. *non metallo-carbapenemase-A*), dokazana u vrsti *Enterobacter cloacae*.¹⁷

Prema revidiranoj Amblerovoj klasifikaciji karbapenemaze su na osnovi rasporeda aminokiselina i prema molekularnoj strukturi raspoređene u skupine A, B, C i D. Epidemiološki i klinički važne karbapenemaze pripadaju skupini A (penicilinazama), skupini B (metalo-beta-laktamazama) i skupini D (oksalicilinazama). Određene su kromosomski ili plazmidno, često povezane s integronima i transposonima, što pogoduje širenju otpornosti i među nefermentorima i vrstama porodice *Enterobacteriaceae*. Prve karbapenemaze prenosive plazmidima zabilježene u Europi s kraja prošlog stoljeća bile su metalo-beta-laktamaze VIM-1 (engl. *Verona integron metallo-beta-lactamase*) u vrsti *Pseudomonas aeruginosa* i IMP-1 (engl. *imipenemase*) u vrsti *Acinetobacter baumannii*.^{18,19} Prvi *Pseudomonas aeruginosa* u kojeg je dokazana metalo-beta-laktamaza VIM-2 opisan je i u Hrvatskoj 2003. godine.²⁰ Godine 2001. dokazane su metalo-beta-laktamaze prenosive plazmidima i među enterobakterijama.²¹⁻²³ Skupini metalo-beta-laktamaza pripada i karbapenemaza NDM-1 (engl. *New Delhi metallo-beta-lactamase*), koja se 2008. godine pojavila u vrsti *Klebsiella pneumoniae*.²⁴ U sljedeće dvije godine proširila se diljem svijeta, zabilježena je u 13 europskih zemalja, a 2009. godine prvi put je izolirana i u Hrvatskoj.²⁵⁻²⁷

Posebnu pozornost zaslužuju karbapenemaze prenosive plazmidima grupe KPC (engl. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Klinički i epidemiološki prvo su se nametnule kao vodeći problem stečene otpornosti na karbapeneme u Sjedinjenim Američkim Državama, a zatim i diljem svijeta.^{28,29} U Europi je KPC *Klebsiella pneumoniae* prvi put dokazana 2005. godine u Francuskoj, a u epidemijom obliku zabilježena je u Izraelu dvije godine kasnije.^{30,31} Grčka bilježi endemsku pojavnost KPC i VIM-karbapenemaza u vrsti *Klebsiella pneumoniae*.^{32,33} Prvi put KPC *Klebsiella pneumoniae* dokazana je 2011. godine i u Hrvatskoj.³⁴ Kar-

bapenemaze iz KPC-grupe izolirane su i u drugim vrstama iz porodice *Enterobacteriaceae* i trenutačno su najzastupljenije karbapenemaze među enterobakterijama u Europi.³⁵⁻³⁸

Ovaj rad upućuje na zapažanje da raznolikoj otpornosti na karbapeneme unatoč prevladavajućem načinu prijenosa plazmidima, pridonose i rijetko viđene kromosomske karbapenemaze.

Novi mehanizmi otpornosti na antibiotike i potreba za njihovom što bržom, ali pouzdanom identifikacijom, stavljaju pred kliničke mikrobiologe sve više izazova. Jedan od njih je prepoznavanje stečene otpornosti na karbapeneme koji se često rabe u teškim infekcijama uzrokovanim višestruko otpornim gram-negativnim mikroorganizmima. Pojavnost sojeva s različitim stupnjevima otpornosti na karbapeneme, od smanjeno osjetljivih do visoko otpornih, može se objasniti činjenicom da određeni tipovi karbapenemaza pokazuju različitu enzimatsku izražajnost, da se pojavljuju samostalno ili u kombinaciji s drugim beta-laktamazama, katkad udruženi i s drugim mehanizmima otpornosti.^{4,6,7} Pravilno očitavanje testova osjetljivosti podrazumijeva ne samo prepoznavanje različitih profila otpornosti već i analizu dodatnih testova u sojeva u kojih postoji sumnja na prisutnost nekog od novih oblika otpornosti.³⁹ Konačna potvrda prisutnosti karbapenemaza temelji se na nekoj od molekularnih metoda. Valja očekivati da će se u budućnosti otpornost na ovu skupinu antibiotika sve češće pojavljivati, i zbog njihove velike upotrebe i zbog učinkovitoga horizontalnog prijenosa gena odgovornih za njezino pojavljivanje.

Podrijetlo karbapenemaza ostaje nejasno, predci gena su nepoznati, ali nasljeđe u obliku karbapenemaza potvrđeno je ranih 80-ih godina prošlog stoljeća izolacijom soja *Serratia marcescens* sa SME-1, *Enterobacter cloacae* s IMI-1 i *Acinetobacter baumannii* s OXA-23-karbapenemazom.⁴⁰ Time je potvrđeno prethodno razmišljanje da za pojavnost karbapenemaza nije odgovorna klinička upotreba imipenema započeta 1985. godine, ali valja pretpostaviti da je njegova upotreba potaknula njihovu veću pojavnost.

Potrebno je naglasiti da u prosincu 2010. godine, u trenutku izolacije ovog soja nije bila precizno određena relevantna metodologija kojim specifičnim, ponajprije fenotipskim testovima možemo potvrditi sumnju na prisutnost karbapenemaza.⁴

Identifikacija i pravilno prepoznavanje antimikrobne osjetljivosti mikroorganizama preduvjet su za brzi odabir primjerene antimikrobne terapije. Uz pravilnu identifikaciju vrste, što u ovom slučaju nije bilo problem, najveći je izazov bio prepoznati mehanizme otpornosti. Vrste roda *Enterobacter* prirodno su otporne na aminopeniciline, ureidopeniciline, cefalosporine uskog spektra (cefalosporini I. generacije) i cefoksitin, a otpornost na cefalosporine II. i III. generacije određena u ovom slučaju posljedica je derepresije kromosomski određenih inducibilnih AmpC-cefalosporinaza. U ovog soja nije potvrđena prisutnost enzima ESBL. Tomu u prilog ide i dobra osjetljivost na cefepim. Prisutnost AmpC-cefalosporinaza može biti razlogom pojave otpornosti i na karbapeneme kad su u pitanju sojevi sa smanjenom propusnosti stanične stijenke. Valja pretpostaviti da bi u tom slučaju otpornost na karbapeneme bila manja ili eventualno samo vidljiva na ertapenem. Kako je sumnja na prisutnost karbapenemaza bila utemeljena na visokom stupnju otpornosti na sva tri karbapenema, to je dodatno učinjen i modificirani Hodgeov test. To je test dobre osjetljivosti uz napomenu da su mogući lažno negativni rezultati kad su u pitanju NDM-metalo-beta-laktamaze, a nedostatak mu je manja specifičnost, zbog hiperprodukcije AmpC i CTX-M-beta-laktamaza proširenog spektra.⁷

Pozitivan Hodgeov test pokazuju sojevi koji posjeduju karbapenemaze različitih skupina, pa je za njihovo razlikovanje potrebno dodatno testiranje. Za potvrdu karbapenemaza iz skupine A rabi se kombinirani disk (engl. *combination disk test*, CDT) karbapenemskog antibiotika i fenilboronične kiseline (engl. *phenylboronic acid*, PBA). Ispitivanja su pokazala da se od kombiniranih diskova u kojima se rabe karbapenemi s različitim koncentracijama PBA najboljim pokazao meropenemski disk s 400 µg fenilboronične kiseline kao test odlične osjetljivosti i specifičnosti.^{41,42} Ako disk meropenema s dodatkom 400 µg PBA, u odnosu na disk koji sadržava samo meropenem, u standardnom testu osjetljivosti pokazuje veću zonu inhibicije rasta za najmanje 5 mm, može se potvrditi da soj stvara karbapenemazu skupine A. Važno je naglasiti i primjenu kombiniranog diska meropenema s kloksacilinom. Sojevi u kojima postoji hiperprodukcija AmpC-cefalosporinaza također su pozitivni u testu s PBA, ali za razliku od sojeva s karbapenemazama iz skupine A pokazuju sinergiju s kloksacilinom, koja se, kao i u prethodnom testu, očituje povećanjem zone inhibicije.⁵ U literaturi su opisani postupci za otkrivanje AmpC-cefalosporinaza s diskom meropenema i kloksacilinom u koncentraciji od 750 µg, ali i komercijalni pripravci (Rosco Diagnostica, Danska) koji rabe kombinirane diske cefalosporina III. generacije s kloksacilinom.⁵ Kombinirani disk-test s dipikoliničnom kiselinom od 1000 µg rabi se za dokaz prisutnosti metalo-beta-laktamaza, po istim kriterijima kao i u prethodno opisanih testova.⁵ Kako se opisani testovi za potvrdu i razlikovanje pojedinih skupina karbapenemaza nisu mogli provesti u Zavodu za kliničku mikrobiologiju i hospitalne infekcije Kliničke bolnice »Sveti Duh«, soj je testiran u Referentnom centru Ministarstva zdravlja za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike, u kojem je fenotipski potvrđena prisutnost karbapenemaze iz skupine A. Važno je istaknuti da podaci iz literature upućuju na zapažanje da je u prisutnosti karbapenemaza MIK za ertapenem često viši od vrijednosti MIK-a za imipenem i meropenem pa je zato u svakom slučaju smanjene osjetljivosti na ertapenem obvezno soj dodatno analizirati kako bi se odredilo o kojem se mehanizmu otpornosti radi.⁷ Kao i u slučaju Hodgeovog testa koji treba oprezno interpretirati zbog mogućnosti pojave lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata, važno je naglasiti da i ertapenemu nedostaje specifičnosti kad je u pitanju otkrivanje prisutnosti karbapenemaza. Zato i najmanje smanjenje osjetljivosti na bilo koji karbapenem među enterobakterijama prema novim EUCAST-preporukama iz 2012. godine, a u skladu s »cut-off« vrijednostima treba testirati na prisutnost karbapenemaza.⁴³

Liječenje infekcija izazvanih višestruko otpornim enterobakterijama pravi je izazov zbog ograničenih terapijskih mogućnosti. Razlikuju se i mišljenja o izboru najučinkovitije terapije u infekcijama izazvanim enterobakterijama smanjene osjetljivosti ili otpornosti na karbapeneme, ponajprije zbog nedostatka kontroliranih prospektivnih studija.^{3,44-46}

EUCAST-standardi, koji se rabe od početka lipnja 2010. godine u mikrobiološkim laboratorijima u Republici Hrvatskoj određuju osjetljivost enterobakterija na meropenem i imipenem ako je MIK ≤ 2 µg/mL, a na ertapenem $\leq 0,5$ µg/mL, neovisno o prisutnosti karbapenemaza. Te su prijelomne točke (engl. *breakpoints*) izabrane ponajprije s ciljem usmjeravanja odluke o primjeni karbapenema u liječenju, a ne kao kriterij za procjenu postoji li neki mehanizam otpornosti. Stoga proizlazi pitanje imaju li u slučaju dobre osjetljivosti ili otpornosti nižeg stupnja, unatoč prisutnim karbapenemazama, karbapenemi i dalje svoje mjesto u terapiji. U

bolesnika s teškim infekcijama, u kojih enterobakterije pokazuju smanjenu osjetljivost ili otpornost na karbapeneme posredovanu karbapenemazama, liječenje je utemeljeno na podacima prikaza slučaja, manjih serija bolesnika, retrospektivnih i rijetkih prospektivnih studija pa je to razlog da za sada ne postoje precizno određene preporuke vezane za izbor lijeka, kombinaciju lijekova, dozu i trajanje terapije.^{3,44,46-50}

Farmakokinetiske i farmakodinamske karakteristike karbapenema upućuju na moguću produljenu primjenu meropenema (u infuziji do 3 sata) u povišenim dozama od 2 g svakih 8 sati kao mogući terapijski protokol u liječenju enterobakterija u kojih je MIK na karbapeneme ≤ 4 µg/mL. Poznata je činjenica da je za djelotvornost karbapenema kad su u pitanju gram-negativni mikroorganizmi potrebno osigurati serumsku koncentraciju lijeka iznad MIK-a uzročnika najmanje 50% razdoblja doziranja. Uz uvjet produljene primjene karbapenema do 3 sata i standardne doze od 1 g svakih 8 sati postiže se serumska koncentracija iznad 2 µg/mL cijelo razdoblje doziranja. Ako se u terapijskom protokolu upotrijebi produljena primjena meropenema u dozi od 2 g svakih 8 sati, moguće je postići koncentraciju 4 µg/mL cijelo razdoblje doziranja.⁵⁰ Najniža stopa mortaliteta zabilježena je u bolesnika u kojih se kombinirala primjena dvaju aktivnih lijekova od kojih je jedan meropenem, uz uvjet da je MIK ≤ 4 µg/mL, a drugi aminoglikozid, kolistin ili tigeciklin.⁴⁸ Pritom treba naglasiti da u ovoj terapijskoj kombinaciji nije preporučljivo primijeniti imipenem zbog niže stabilnosti na sobnoj temperaturi, kao i zbog lošije podnošljivosti u višim dozama.⁵¹ Moguće je primijeniti i kombinacije tigeciklina s aminoglikozidima ili kolistinom, ali prema dostupnim podacima slabije su efikasnosti od kombinacija s karbapenemima.⁵⁰ Kolistin je jedan od rijetkih antibiotika koji pokazuje dobru osjetljivost u enterobakterija s KPC i MBL-karbapenemazama, ali se s obzirom na farmakodinamska ograničenja s oprezom primjenjuje kao monoterapija.⁵² Pojava heterorezistencije, kao i pojava potpune rezistencije na kolistin, dodatno otežavaju već ionako sužen izbor primjerene terapije.⁵³ Poseban je problem terapija pneumonija, osobito onih povezanih s mehaničkom ventilacijom. Povoljan ishod liječenja pneumonija moguće je očekivati primjenom kombinirane terapije karbapenema i kolistina, visokih doza tigeciklina i kolistina, ali i kolistina s aminoglikozidima.^{54,55} Zabilježena je i otpornost na tigeciklin, a povezuje se kao u slučaju otpornosti na karbapeneme i kolistin s njegovom prethodnom primjenom.⁵⁶

Iz dostupnih podataka o mogućem izboru antibiotika u liječenju infekcija izazvanih enterobakterijama otpornima na karbapeneme upozoravamo i na kombinaciju kinolona i aminoglikozida.⁷ Iz dostupnog rada Falcone i suradnika razvidno je da je infekcija kože i potkožnog tkiva uzrokovana VIM-1-karbapenemazom u soja *Enterobacter cloacae* uspješno izliječena kombinacijom ciprofloksacina i amikacina, pa je to bio razlog što smo se odlučili za tu terapijsku kombinaciju i u ovog bolesnika. Posebno se naglašava potreba za produženim trajanjem terapije, ali bez obzira na to koji se terapijski protokol primijenio, upozoreno je na veću vjerojatnost relapsa infekcija izazvanih enterobakterima s prisutnim karbapenemazama. Ponovljena izolacija vrste *Enterobacter cloacae* iz dodatnih uzoraka tkiva i obrisaka rane u ovog bolesnika procijenjena je na osnovi kliničke slike, kao i na osnovi mikroskopskog preparata u kojem nisu videne kolonizirane upalne stanice.

Pojava sojeva s novim i kompleksnim mehanizmima otpornosti podrazumijeva precizno određivanje osjetljivosti, pravilan odabir dodatnih potvrđnih testova i dobru suradnju

s kliničarima i radi odabira primjerene terapije i radi provođenja svih mjera kojima bi se spriječilo širenje višestruko otpornih sojeva. Ranim otkrivanjem uzročnika infekcije, izolacijom bolesnika, provođenjem svih standardnih mjera i svih mjera opreza kod infekcija koje se prenose kontaktom, spriječeno je širenje izoliranog otpornog soja na druge bolesnike. Kako je naknadnom molekularnom analizom potvrđeno kromosomska određena IMI-1-karbapenemaza nema većeg potencijala širenja, što se očitovalo i mirnom epidemiološkom situacijom.

Izolacija soja *Enterobacter cloacae* s ovim oblikom otpornosti izuzetno je rijetka, što potvrđuje i činjenica da je prvi takav soj u Europi dokazan i opisan 2012. godine.⁵⁷

Zaključak

Različiti mehanizmi otpornosti vrlo često udruženim djelovanjem otežavaju interpretaciju testova osjetljivosti. Dodatni, potvrđni fenotipski testovi obvezni su u njihovu preciznom prepoznavanju, što je od velike kliničke, ali ne manje važne epidemiološke vrijednosti. Prvo zbog izbora najučinkovitije terapije, a drugo zbog dosljednog provođenja svih mjera u sprječavanju širenja višestruko otpornih mikroorganizama. Ovaj je rad prijedlog kako do sada u literaturi opisane potvrđne testove rabiti u svakodnevnom radu kliničkih mikrobioloških laboratorija. Budući da primjena karbapenema zasigurno utječe na selekciju otpornih sojeva, to će njihova razumna primjena omogućiti da sami ili u kombinaciji s drugim antimikrobnim lijekovima ostanu čvrst oslonac u liječenju teških bolničkih infekcija izazvanih višestruko otpornim mikroorganizmima. Posebno ističemo svakodnevnu obvezu svih zdravstvenih radnika da dosljedno provode standardne mjere higijene koje s mjerama kontaktne izolacije efikasno sprječavaju širenje otpornih bolničkih mikroorganizama.

LITERATURA

- Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp. Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(2):220–41.
- Liu YC, Chen TL, Chen HS i sur. Clinical characteristics and risk factors for attributable mortality in *Enterobacter cloacae* bacteraemia. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:67–72.
- Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M i sur. Infections with VIM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3514–9.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M i sur. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:112–22.
- Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O i sur. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamase 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):552–6.
- Birgy Y, Bidet P, Genel C i sur. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1295–302.
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG i sur. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:432–8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 19th Informational Supplement. CLSI document M100-S19. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/> dostupno od travnja 2010. godine).
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK i sur. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007;45:2723–25.
- Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Mentis AF i sur. Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability. *FEMS Microbiol Lett* 1992;74(2–3):195–9.
- Thompson KS, Sanders CC, Chmel H. Imipenem resistance in *Enterobacter*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12(8):610–13.
- Mainardi JL, Mugnier P, Coutrot A i sur. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(11):2352–4.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N i sur. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT₁, a plasmid mediated AmpC beta-lactamase and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(3):563–9.
- Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW i sur. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3817–22.
- Gayet S, Cholet R, Molle G i sur. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1555–9.
- Nordmann P, Mariotte S, Naas T i sur. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of a gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(5):939–46.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A i sur. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1584–90.
- Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A i sur. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet* 1999;353:899–900.
- Sardelić S, Pallecchi L, Punda-Polić V i sur. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase determinants, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2003;9(8):1022–3.
- Miriagou V, Tzelepi E, Giannelli D i sur. *Escherichia coli* with a self transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:395–7.
- Galani I, Souli M, Chryssouli Z i sur. 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;55:634–8.
- Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of a current evidence. *Euro Surveill* 2008; 13(4) pii = 8023.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG i sur. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene bla(NDM-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; 53:5046–54.
- Struelens M. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15(46): pii=19716.
- Nordmann P, Poirel L, Toleman MA i sur. Does broad-spectrum beta-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;66:689–92.
- Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarin P i sur. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2012;18(3):532–4.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ i sur. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151–61.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17(10):1791–8.
- Naas T, Nordmann P, Vedel G i sur. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4423–4.
- Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky A i sur. Emergence of KPC2 and KPC3 in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Israel hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3026–9.
- Giakkoupi P, Maltezou H, Polemis M i sur. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyper-epidemic clone. *Euro Surveill* 2009;14(21):pii=19218.
- Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E i sur. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004–2010. *Euro Surveill* 2012;17(7):pii=20088.
- Bedenic B, Mazzariol A, Plecko V i sur. First report of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. *J Chemother* 2012;24(4):237–9.
- Bratu S, Brooks S, Burney S i sur. Detection and spread of *E. coli* possessing the plasmid borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn New York. *Clin Infect Dis* 2007;44:972–5.
- Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(49):1413–8.
- Gomez-Gil MR, Pano-Pardo JR, Romero-Gomez MP i sur. Detecting of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(12):2695–7.

38. *Canton R, Akova M, Carmeli Y i sur.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413–31.
39. *Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K i sur.* Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3420–6.
40. *Rasmussen JW, Hoiby N.* Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60(3):470–82.
41. *Pournaras S, Poulou A, Tsakris A i sur.* 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.
42. *Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A i sur.* Comparative evaluation of combined-disk test using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2011;49:2804–9.
43. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).* Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/> dostupno od prosinca 2012. godine).
44. *Hirsch EB, Tam VH.* Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). An emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1119–25.
45. *Arnold RS, Thom KA, Sharma S i sur.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *South Med J* 2011;104(1):40–5.
46. *Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G i sur.* Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:102–11.
47. *Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR i sur.* Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis* 2008;46:567–70.
48. *Souli M, Kontopidou F, Papadomichelakis E i sur.* Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek university hospital. *Clin Infect Dis* 2008;46:847–54.
49. *Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M i sur.* Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1868–73.
50. *Daikos GL, Markogiannakis A.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1135–41.
51. *Keel RA, Sutherland CA, Crandon JL i sur.* Stability of doripenem, imipenem and meropenem at elevated room temperatures. *Int J Antimicrob Ag* 2011;37:174–85.
52. *Poudyal A, Howden BP, Bell JM.* In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1311–18.
53. *Bogdanovich T, Adams Haduch JM, Tian GB i sur.* Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone. *ST258. Clin Infect Dis*;2011;53(4):373–6.
54. *Falagas ME, Rafailidis PI.* Colistin in ventilator associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2012;54(5):681–3.
55. *Humphries RM, Kelesidis T, Dien Bard J i sur.* Successful treatment of pan resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. *J Med Microbiol* 2010;59:1383–6.
56. *Spanu T, De Angelis G, Cipriani M i sur.* In vivo emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(8):4516–8.
57. *Naas T, Cattoen C, Bernusset S i sur.* First identification of bla_{IMI-1} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(3):1664–5.

* * *

Vijesti News



Hrvatski liječnički zbor
Hrvatsko pedijatrijsko društvo
Hrvatsko društvo za školsku i sveučilišnu medicinu
Klinički bolnički centar Split
organiziraju

HRVATSKU PROLJETNU PEDIJATRIJSKU ŠKOLU

31. seminar za liječnike i medicinske sestre

Split, 7.–11. travnja 2014.

Na programu ovogodišnjeg seminara su sljedeće teme:

1. PULMOLOGIJA
2. DJEČJA KIRURGIJA – VEZIKOURETERALNI REFLUKS
3. PREHRANA

Informacije: Prof. dr. sc. Vjekoslav Krželj

Klinika za dječje bolesti, Klinički bolnički centar Split, Spinčićeva 1, 21 000 Split

Tel. 021/556-303; faks: 021/556-590

E-mail: krzelj@kbsplit.hr; <http://hpps.kbsplit.hr>

Kotizacija: 1.000,00 kuna

