

## Izvorni radovi

### Original articles

# EVOLUCIJA REZISTENCIJE NA BETA-LAKTAMSKE ANTIBIOTIKE U *ENTEROBACTER SPP.* U HRVATSKOJ

## EVOLUTION OF BETA-LACTAM ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *ENTEROBACTER SPP.* IN CROATIA

IRENA FRANOLIĆ-KUKINA, SANDA SARDELIĆ, NATAŠA BEADER, DIJANA VARDA-BRKIĆ,  
NATAŠA FIRIS, MARKO ČAČIĆ, DOROTEA ŠIJAK, SONJA FRANČULA-ZANINOVIĆ,  
VESNA ELVEDI-GAŠPAROVIĆ, IVANA MAREKOVIĆ, AMARELA LUKIĆ-GRLIĆ,  
MIHAELA AJMAN, BRANKA BEDENIĆ\*

**Deskriptori:** Cefalosporini – farmakologija; Enterobacter – djelovanje lijeka, enzimologija, genetika, izolacija; Bakterijska otpornost na lijekove – djelovanje lijeka, genetika; Beta – laktamaze – genetika, metabolizam; Plazmidi – analiza, genetika; Bakterijske bjelančevine – genetika, metabolizam; Testovi osjetljivosti mikroba; Hrvatska – epidemiologija

**Sažetak.** Rezistencija na cefalosporine proširenog spektra u *Enterobacter* spp. nastaje zbog indukcije ili derepresije AmpC-β-laktamaze, produkcije β-laktamaza proširenog spektra (ESBL) ili karbapenemaza. Cilj istraživanja bio je utvrditi mehanizme rezistencije na β-laktamske antibiotike na kolekciji od 58 izolata prikupljenih metodom slučajnog odabira u tri klinička centra u Hrvatskoj i Kantonalnom zavodu za javno zdravstvo Zenica u Bosni i Hercegovini u razdoblju od 2008. do 2011. godine, kao i utvrditi evoluciju rezistencije na tu skupinu antibiotika tijekom perioda istraživanja. Pretpostavka je istraživanja da će izolati *Enterobacter* spp. rezistentni na ceftazidim pokazivati različite mehanizme rezistencije od inducibilne i dereprimirane AmpC-β-laktamaze do β-laktamaza proširenog spektra, a u kasnijim godinama i karbapenemaza. Očekivana je i razlika u fenotipu i mehanizmima rezistencije između različitih centara. Osjetljivost na antibiotike testirana je metodom dilucije u bujonu, a geni rezistencije testirani su PCR-om. Plazmidi su karakterizirani tipizacijom replikona PCR-om. Istraživanje je pokazalo dominaciju β-laktamaza proširenog spektra iz porodice CTX-M u kombinaciji s derepresijom AmpC-β-laktamaze kao dominantan mehanizam rezistencije na cefalosporine proširenog spektra. Plazmidi koji su kodirali ESBL pripadali su različitim inkompatibilnim grupama. U izolatima iz KBC-a Zagreb zapažena je u posljednjoj godini istraživanja (2010.) pojava prvih metalo-β-laktamaza iz VIM-serije, što pokazuje evoluciju rezistencije na cefalosporine proširenog spektra od dereprimiranih AmpC-β-laktamaza i ESBL-a na početku istraživanja do karbapenemaza na njegovu kraju.

**Descriptors:** Cephalosporins – pharmacology; Enterobacter – drug effects, enzymology, genetics, isolation and purification; Drug resistance, bacterial – drug effects, genetics; Beta – lactamases – genetics, metabolism; Plasmids – analysis, genetics; Bacterial proteins – genetics, metabolism; Microbial sensitivity tests; Croatia – epidemiology

**Summary.** *Enterobacter* spp. develops resistance to expanded-spectrum cephalosporins by induction or derepression of chromosomal AmpC β-lactamase, or production of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) or carbapenemases. The aim of the study was to analyze the mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins and the evolution of resistance mechanism during the study period (2008–2011) on a collection of 58 randomly collected *Enterobacter* spp. strains from three hospital centers in Croatia and Bosnia and Herzegovina during 2008-2010. The antibiotic susceptibility was determined by broth microdilution method according to CLSI. Resistance genes were determined by PCR. Plasmids were characterized by PCR-based replicon typing (PBRT). The hypothesis of the study was that there will be multiple mechanisms of ceftazidime resistance involved, from inducible and derepressed AmpC β-lactamases to extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases at the end of the study. The isolates from different centers were expected to express different phenotypes and mechanisms of resistance. The study showed the predominance of derepressed AmpC β-lactamases combined with ESBLs belonging to CTX-M family as a mechanism of resistance to expanded-spectrum cephalosporins. The emergency of MBLs was reported in the last year of the study in University Hospital Center Zagreb. The plasmids

\* **Zavod za mikrobiologiju, Zavod za javno zdravstvo Gospić** (Irena Franolić-Kukina, dr. med.), **Zavod za mikrobiologiju, KBC Split** (dr. sc. Sanda Sardelić, dr. med.), **Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Zagreb** (Dijana Varda-Brkić, dr. med.; Nataša Firis, dr. med.), **Bolnica St. Antonius Kleve, Njemačka** (Marko Čačić, dr. med.), **Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** (Dorothea Šijak, cand. med.), **Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb** (doc. dr. sc. Nataša Bader, dr. med.; doc. dr. sc. Ivana Mareković, dr. med.; prof. dr. sc. Branka Bedenić, dr. med.), **Dom zdravlja Centar, Zagreb** (Sonja Frančula-Zaninović, dr. med.), **Klinika za ginekologiju i opstetriciju, KBC Zagreb,**

**Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** (doc. dr. sc. Vesna Elvedi-Gašparović, dr. med.), **Klinika za dječje bolesti Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** (izv. prof. dr. sc. Amarela Lukić-Grlić, dr. med.), **Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije** (Mihaela Ajman, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. B. Bedenić, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, e-mail: [branka.bedenic@kbc-zagreb.hr](mailto:branka.bedenic@kbc-zagreb.hr), [bbedenic@mef.hr](mailto:bbedenic@mef.hr)

Primljeno 8. travnja 2016., prihvaćeno 18. srpnja 2016.

encoding ESBLs belonged to different incompatibility groups. This points out to the evolution of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacter* spp. from derepressed AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBL to carbapenemases.

Liječ Vjesn 2016;138:240–249

*Enterobacter* je rod koji svrstavamo u porodicu *Enterobacteriaceae*, a koja obuhvaća nekoliko međusobno sličnih rodova gram-negativnih štapićastih bakterija, fakultativnih anaeroba. Poznato je više vrsta enterobaktera: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter hormaechei* i *Enterobacter amnigenus*. Dvije vrste koje najčešće izazivaju infekcije jesu *E. aerogenes* i *E. cloacae*, a rjeđe *E. agglomerans* i *E. sakazakii*. Te infekcije najčešće su bolničke, a rijetko izvanbolničke. Izvor infekcije može biti endogen – kolonizacija kože, gastrointestinalnog trakta, urinarnog trakta, ili egzogen – rezultat ubikvitarnosti enterobaktera.<sup>1</sup> Čimbenici rizika od nastanka infekcija povezanih sa zdravstvenom skrbi jesu: hospitalizacija koja traje više od 2 tjedna, invazivni postupci u posljednja 72 sata, prisutnost centralnoga venskoga katetera, antibiotska terapija unatrag 30 dana provođena monoterapijom, teže maligne bolesti i imunosupresija.<sup>2</sup>

Klinički sindromi koji se javljaju kao infekcije uzrokovane enterobakterom: infekcije urinarnog trakta, sepsa, meningitis, infekcije rana, oka, uha, abdominalne infekcije (peritonitis), infekcije donjega respiratornog trakta (traheobronhitis, pneumonija, komplikacije KOPB-a), rjeđe osteomijelitis. Češće se javljaju u starije populacije i male djece.<sup>2</sup> Jake bolničke infekcije uzrokovane enterobakterom teško se liječe, a i testiranje antimikrobne osjetljivosti može biti povezano s mnogobrojnim problemima.<sup>3,4</sup>

Zbog slabe toksičnosti i visoke djelotvornosti  $\beta$ -laktamski antibiotici najčešće su upotrebljavani antimikrobni lijekovi u kliničkoj praksi. Dok u nekih gram-pozitivnih bakterija još nije utvrđena rezistencija na penicilin, enterobakterije su najočitiji primjer razvoja multirezistentnih bakterija kao posljedice upotrebe antibiotika širokog spektra, posebice cefalosporina.<sup>5</sup> Produkcija kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze tipičan je mehanizam rezistencije na cefalosporine proširenog spektra u *Enterobacter* spp.<sup>6–9</sup> Kromosomska AmpC- $\beta$ -laktamaza enzim je koji uzrokuje intrinzičnu rezistenciju na peniciline, kombinacije penicilina s inhibitorima  $\beta$ -laktamaza, prvu generaciju cefalosporina i cefamicine. Izlaganje  $\beta$ -laktamskim antibioticima može inducirati ekspresiju AmpC- $\beta$ -laktamaze u enterobaktera, što dovodi do rezistencije na treću generaciju cefalosporina.<sup>10–12</sup> Rezistencija na cefalosporine proširenog spektra u *Enterobacter* spp. može biti posljedica indukcije ili derepresije. Indukcija je privremeni događaj koji nastaje kada induktor stvori kompleks s ampD-proteinom, koji se u tom slučaju ne veže na represor. Derepresija je trajno stanje koje nastaje spontanom mutacijom koja proizvodi defektan ampD-protein koji se ne može vezati na represor (ampR-protein) i perzistira nakon uklanjanja inducirajućeg agensa. Dereprimirani mutanti mogu proizvesti velike količine  $\beta$ -laktamaze neovisno o prisutnosti ili odsutnosti induktora jer im nedostaje represorski mehanizam. Stopa mutacije u sojeva roda *Enterobacter* i vrste *Citrobacter freundii* najveća je pa je neuspjeh terapije cefalosporinima treće generacije u tih enterobakterija najveći. Djelomično dereprimirani mutanti javljaju se s frekvencijom od  $10^{-6}$  do  $10^{-7}$ , dok se potpuno dereprimirani mutanti koji imaju i smanjenu osjetljivost na cefepim pojavljuju s frekvencijom od  $10^{-7}$  do  $10^{-9}$ .<sup>13</sup> Četvrta generacija cefalosporina stabilna je prema AmpC- $\beta$ -laktamazi i ne podliježe hidrolizi kromosomskom AmpC- $\beta$ -laktamazom osim pri iz-

razitoj hiperprodukciji pa cefepim može biti prikladna terapijska opcija.<sup>13</sup> Iako rjeđe, *Enterobacter* može producirati i  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL) (osobito *Enterobacter cloacae*).<sup>14,15</sup>

ESBL hidroliziraju peniciline i cefalosporine svih generacija, ali ne djeluju na cefamicine i karbapeneme. Tri najvažnije porodice ESBL-a jesu: TEM, SHV i CTX-M. TEM i SHV- $\beta$ -laktamaze nastale su mutacijama od parentalnih  $\beta$ -laktamaza širokog spektra TEM-1, TEM-2 i SHV-1, dok su CTX-M- $\beta$ -laktamaze nativne ESBL. CTX-M- $\beta$ -laktamaze dijele se u pet grupa na temelju sličnosti u sekvenciji aminokiselina: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25. Za razliku od AmpC- $\beta$ -laktamaza osjetljive su na inhibiciju klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom.<sup>14,15</sup> Najčešći tipovi ESBL-a u enterobakteru jesu CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14<sup>16–17</sup> i TEM-24.<sup>18</sup> Opisani su i rjeđi tipovi ESBL-a kao što je IBC.<sup>19</sup> Nedavno su opisani i izolati enterobaktera pozitivni na CTX-M-1, CTX-M-3 i CTX-M-15 iz uzoraka vode jezerâ u Švicarskoj.<sup>20</sup>

U posljednjih desetak godina opisana je i pojava karbapenemske rezistencije u enterobaktera.<sup>21</sup> Karbapenemaze su enzimi koji hidroliziraju karbapeneme, a mogu biti kodirani kromosomski ili plazmidno. Dijele se u klase A (KPC, SME, IMI, NMC), B (VIM, IMP, SPM, GIM, NDM, SIM, DIM, AIM) i D (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-58, OXA-143, OXA-48).<sup>21</sup> U klasi A nalaze se NMC-A i IMI-1 koje su opisane sporadično u enterobaktera, a kodirane su kromosomski.<sup>22–24</sup> KPC- $\beta$ -laktamaze prvo su opisane u *K. pneumoniae*, ali su se kasnije proširile među ostalim enterobakterijama uključujući i *Enterobacter* spp. Kodirane su plazmidno.<sup>24</sup>

Metallo- $\beta$ -laktamaze klinički su najvažnije karbapenemaze. Pripadaju većem broju porodica, a najvažnije su one iz serija VIM, IMP i NDM. Metallo- $\beta$ -laktamaze najčešće proizvode nefermentirajuće bakterije kao što su *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, ali se u najnovije vrijeme često javljaju i u enterobakterija. Prva je opisana u Japanu 1990.<sup>25</sup> Kodirane su na plazmidima i integronima, a najviše izvještaja o njima ima iz Europe, Japana i jugoistočne Azije. Prva VIM-metallo- $\beta$ -laktamaza izolirana je iz *Pseudomonas aeruginosa* iz Verone, a naziv potječe od *Verona integron associated metallo- $\beta$ -lactamases*.<sup>26</sup> Metallo- $\beta$ -laktamaze, najčešće iz serija VIM, IMP i NDM opisane su i u enterobaktera.<sup>27–29</sup>

U novije vrijeme opisana je u enterobaktera i OXA-48- $\beta$ -laktamaza koja pripada grupi D.<sup>30,31</sup> Enterobakteri mogu razviti rezistenciju na karbapeneme zbog hiperprodukcije  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra ili plazmidnih AmpC- $\beta$ -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane.<sup>21</sup>

U nas je opisana rezistencija na karbapeneme u enterobaktera zbog produkcije VIM-1-metallo- $\beta$ -laktamaze u izolatima *E. cloacae* iz 2012. i 2013.<sup>32,33</sup> U 2014. opisana je epidemija uzrokovana VIM-1-pozitivnim enterobakterom,<sup>34</sup> kao i IMI-1- $\beta$ -laktamaza koja pripada u klasu A.<sup>35</sup>

Iako CLSI ne preporučuje rutinsko testiranje izolata *Enterobacter* spp. na produkciju  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra,<sup>36–38</sup> u literaturi se sve češće opisuju ESBL-pozitivni *Enterobacter*.<sup>16–19</sup> Kod vrsta iz roda enterobakter detekcija je produkcije ESBL-a otežana zbog antagonističkog efekta kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze. U tom slučaju primje-

na klavulanske kiseline za inhibiciju ESBL-a može inducirati ekspresiju kromosomske DNA, antagonizirati antibakterijsku aktivnost partnerskoga  $\beta$ -laktamskog antibiotika i maskirati sinergistički učinak potreban za detekciju ESBL-a.<sup>36-38</sup> Trenutačno ne postoje preporuke CLSI-a za detekciju ESBL-a u mikroorganizmima koji produciraju AmpC, što bi se moglo primjenjivati rutinski u svakom laboratoriju. Čini se da je određivanje MIK-a ceftazidima samog i s klavulanskom kiselinom uz dodatak kloksacilina u podlozi veoma točan, ali ipak prezahtjevan postupak za rutinski rad. EUCAST preporučuje primjenu metode dvostrukog diska za detekciju ESBL-a na Mueller-Hintoninoj ploči koja u agaru ima otopljen kloksacilin (200 mg/L), što je mnogo jednostavnije.<sup>39</sup>

Cilj istraživanja bio je utvrditi mehanizme rezistencije na  $\beta$ -laktamske antibiotike na kolekciji od 58 izolata prikupljenih metodom slučajnog odabira u tri klinička centra u Hrvatskoj i Kantonalnom zavodu za javno zdravstvo Zenica u Bosni i Hercegovini u razdoblju od 2008. do 2011., kao i utvrditi evoluciju rezistencije na tu skupinu antibiotika tijekom perioda istraživanja. Pretpostavka je istraživanja da će izolati *Enterobacter* spp. rezistentni na ceftazidim pokazivati različite mehanizme rezistencije od inducibilne i dereprimirane AmpC- $\beta$ -laktamaze do  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra, a u kasnijim godinama i karbapenemaza. Očekuju se razlike u fenotipu i mehanizmima rezistencije između različitih centara.

## Materijal i metode

### Bakterijski izolati

Izolati *Enterobacter* spp. sa smanjenom osjetljivošću na ceftazidim prikupljeni su metodom slučajnog odabira u razdoblju od 2008. do 2011. godine iz različitih zdravstvenih ustanova: KBC-a Split, KBC-a Zagreb, Opće bolnice Dubrovnik, KBC-a Rijeka i Kantonalnog zavoda za javno zdravstvo Zenica. Sojevi su iz različitih uzoraka najvećim dijelom bolničkih pacijenata, a dva su soja dobivena iz uzoraka hrane. Izolati su identificirani standardnim biokemijskim testovima, a selekcija rezistentnih sojeva obavljena je na temelju disk-difuzijskog testa. Fenotipska i molekularna analiza rezistencije izolata obavljena je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb.

### Testiranje osjetljivosti na antibiotike

Testiranje osjetljivosti na antibiotike obavljeno je disk-difuzijskom metodom i bujonskom mikrodilucijskom metodom prema smjernicama CLSI-a. Sojevi su testirani disk-difuzijskom metodom prema Kirby-Baueru na Mueller-Hintoninu (MH) agaru na ove antibiotike (BioRad, Francuska): amoksicilin (30 mcg), ko-amoksiklav (20/10 mcg), cefuroksim (30 mcg), ceftazidim (30 mcg), cefepim (30 mcg), cefotaksim (30 mcg), ceftriakson (30 mcg), cefoksitin (30 mcg), piperacilin/tazobaktam (100/10 mcg), imipenem (30 mcg), meropenem (30 mcg), gentamicin (10 mcg), amikacin (30 mcg) i ciprofloksacin (30 mcg). Rezultati su interpretirani prema smjernicama CLSI-a.<sup>36</sup>

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) određivana je metodom dilucije u bujonu u mikrotitracijskim pločicama s 96 jažica i Mueller-Hintoninu bujonu.<sup>37-39</sup> U kontroli kvalitete upotrijebljeni su kontrolni sojevi: *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Klebsiella pneumoniae* 7006003 kao preporučeni standardni kontrolni sojevi prema CLSI-u. Sojevi su karakterizirani kao multirezistentni, ekstenzivno rezistentni ili panrezistentni prema kriterijima Magiorakos i sur.<sup>40</sup>

### Fenotipski testovi za detekciju $\beta$ -laktamaza

#### Test indukcije $\beta$ -laktamaze

Inducibilnost produkcije AmpC- $\beta$ -laktamaze testirana je s pomoću cefoksitin-cefotaksimskog antagonističkog testa. Prekonočna kultura testiranog soja razrjeđuje se tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5, što odgovara za  $10^8$  CFU/mL. To se razrjeđenje zasijava na MH agar i zatim se postavljaju diskovi cefoksitina i cefotaksima. Smanjenje inhibicijske zone (engl. *blunting*) oko diska cefotaksima u smjeru prema disku cefoksitina upućuje na inducibilnost produkcije kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze.<sup>41</sup>

#### Metoda dvostrukog diska

Prekonočna kultura testiranog soja razrijeđena je tako da se postigne optička gustoća koja odgovara McFarlandovu standardu 0,5, što odgovara za  $10^8$  CFU/mL. To je razrjeđenje zasijano na MH agar i zatim su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona, cefepima i aztreonama. U sredinu ploče stavljen je disk ko-amoksiklava kao izvor klavulanske kiseline na udaljenosti od 2 do 3 cm od periferičnih diskova. Ploče su inkubirane 18 do 24 h na 35 do 37 °C. Deformacija inhibicijske zone oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama u smjeru prema centralnom disku s klavulanskom kiselinom znači pozitivan rezultat i upućuje na produkciju ESBL-a.<sup>42</sup> S obzirom na to da *Enterobacter* spp. ima kromosomsku AmpC- $\beta$ -laktamazu koja može maskirati sinergistički učinak s klavulanskom kiselinom, na diskove cefalosporina i aztreonama dodano je 400  $\mu$ g boro-nične kiseline (20  $\mu$ L *stock* solucije – 20 g/L) koja inhibira AmpC- $\beta$ -laktamazu.

#### Metoda kombiniranih diskova prema CLSI-u

Prekonočna kultura testiranog soja pripremljena je kao i za prethodnu metodu i zasijana na MH agar koji ima dodatak kloksacilina (200 mg/L) radi inhibicije AmpC- $\beta$ -laktamaze. Na ploču su postavljeni diskovi ceftazidima, cefotaksima, ceftriaksona i aztreonama s dodatkom klavulanske kiseline i bez njega. Klavulanska kiselina kapa se na površinu diska u koncentraciji od 10.000  $\mu$ g/mL. Ploče se inkubiraju 18 do 24 h na 35 do 37 °C. Inhibicijska zona oko cefalosporinskih diskova i diska aztreonama uz dodatak klavulanske kiseline veća za više od 5 mm u odnosu prema kontrolnoj ploči bez klavulanske kiseline dokazuje produkciju ESBL-a.<sup>38</sup>

### Detekcija karbapenemaza

#### Hodgeov test

Modificirani Hodgeov test upotrijebljen je za detekciju karbapenemaza. Soj *E. coli* ATCC 25922 gustoće 0,5 McFarlanda zasijan je na ploču običnog Mueller-Hintonina agara. Soj za testiranje na produkciju karbapenemaza povučen je u obliku crte od sredine prema periferiji ploče. Ploče su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je disk imipenema (10 mcg) stavljen u sredinu ploče koja je inkubirana preko noći. Deformacije inhibicijske zone imipenema oko inokuliranog soja u obliku lista djeteline smatraju se pozitivnim rezultatom, što upućuje na produkciju karbapenemaze.<sup>43</sup>

#### E-test MBL-a

E-test (AB Biodisk, Solna, Švedska) za detekciju metalo- $\beta$ -laktamaza sadržava, s jedne strane, raspon koncentracija

imipenema (4 do 256 mg/L), a, s druge strane, imipenema (1 do 64 mg/L) s EDTA-om. Sniženje MIK-a imipenema za 3 ili više razrjeđenja ( $\geq 8$  puta) u prisutnosti EDTA-e upućuje na produkciju karbapenemaze.<sup>44</sup>

Metoda kombiniranih diskova za detekciju KPC-a i metalo-β-laktamaza

Testirani soj zasijan je na MH agar na koji su stavljeni diskovi imipenema (10 mcg) i meropenema (10 mcg), bez dodatka inhibitora kao kontrole i s dodatkom 20 mL fenilboronične kiseline (PBA) za detekciju produkcije KPC-a, EDTA za detekciju metalo-β-laktamaza ili kombinirano EDTA i PBA za detekciju kombinirane produkcije KPC-a i metalo-β-laktamaza. Povećanje inhibicijske zone oko diska koji sadržava PBA u odnosu prema kontrolnom disku za najmanje 5 mm upućuje na produkciju KPC-a β-laktamaze, povećanje oko diska s EDTA-om za 5 ili više mm na produkciju MBL-a, a povećanje oko diska s oba inhibitora na kombiniranu produkciju KPC-a i MBL-a.<sup>45,46</sup>

#### Definicija fenotipa rezistencije

- GRUPA 1. Dereprimirani AmpC-izolati pokazuju rezistenciju na cefoksitin (promjer inhibicijske zone  $\leq 14$  mm), rezistenciju ili umjerenu osjetljivost na cefotaksim ( $\leq 22$  mm), negativan cefoksitin-cefotaksimski antagonistički test i negativan test na produkciju ESBL-a.<sup>47</sup>
- GRUPA 2. Djelomično dereprimirani AmpC-izolati pokazuju rezistenciju na cefoksitin (promjer inhibicijske zone  $\leq 14$  mm), rezistenciju ili umjerenu osjetljivost na cefotaksim ( $\leq 22$  mm), pozitivan cefoksitin-cefotaksimski antagonistički test i negativan test na produkciju ESBL-a.<sup>47</sup>
- GRUPA 3. Djelomično dereprimirani AmpC-izolati pozitivni na ESBL pokazuju rezistenciju na cefoksitin (promjer inhibicijske zone  $\leq 14$  mm), negativan cefoksitin-cefotaksimski antagonistički test i pozitivan test na produkciju ESBL-a.<sup>47</sup>
- GRUPA 4. Izolati koji nisu dereprimirani i pozitivni su na ESBL pokazuju osjetljivost na cefoksitin (promjer inhibicijske zone  $\geq 18$  mm) i pozitivan ESBL-test, što se vidi iz proširenja inhibicijske zone oko cefepima za najmanje 5 mm u prisutnosti klavulanske kiseline.<sup>47</sup>
- GRUPA 5. Inducibilni AmpC-producenti pokazuju osjetljivost na cefoksitin (promjer inhibicijske zone  $\geq 18$  mm), pozitivan cefoksitin-cefotaksimski antagonistički test i negativan test na produkciju ESBL-a.<sup>47</sup>

#### Konjugacija

Prijenos rezistencije na ceftazidim testiran je metodom konjugacije u bujonu.<sup>48</sup> Kao recipijent upotrijebljeni su sojevi *Escherichia coli* A15R rezistentan na rifampicin i *Escherichia coli* J62 rezistentan na Na azid. Donori i recipijent inokulirani su u srčano-moždani infuzijski bujon, inkubirani 4 – 6 h (do kasne eksponencijalne faze) i zatim zasijani u omjeru 1 : 2 u 5 mL srčano-moždanog infuzijskog bujona. Mješavina donora i recipijenta inkubirana je preko noći i zasijavana na selektivne podloge. Transkonjuganti su selekcionirani na MacConkeyevu agaru koji sadržava ceftazidim (2 mg/L) i rifampicin (256 mg/L) ili Na azid (100 mg/L). Također je testiran kotransfer rezistencije na ne-β-laktamaske antibiotike kao što su aminoglikozidi, tetraciklin, kloramfenikol, sulfonamidi i trimetoprim s obzirom na to da se geni rezistencije na te antibiotike često nalaze na

istom plazmidu kao i gen koji kodira ESBL. Frekvencija prijenosa određivana je relativno u odnosu prema broju stanica donora.

#### Detekcija gena rezistencije

Geni koji kodiraju β-laktamaze širokog i proširenog spektra (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> i *bla*<sub>PER-1</sub>),<sup>49–52</sup> plazmidne AmpC-β-laktamaze,<sup>53</sup> klasu A (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, *bla*<sub>NMC</sub>),<sup>22,54,55</sup> klasu B karbapenemaza (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> i *bla*<sub>NDM</sub>)<sup>25,27,29,56</sup> i oksacilinaze koje hidroliziraju karbapenem (*bla*<sub>OXA-48</sub>)<sup>57</sup> i rezistenciju na fluorokinolone (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) određivani su PCR-om kao što je prethodno opisano.<sup>58,59</sup> Grupa CTX-M-β-laktamaza određivana je multipleksnim PCR-om prema Woodfordu i sur.<sup>60</sup> PCR-mapiranje obavljeno je s početnicama za insercijske sekvencije IS26 i ISE*cpI* u kombinaciji s uzvodnom i nizvodnom početnicom (engl. *forward primer* i *reverse primer*) za *bla*<sub>CTX-M</sub> kako bi se dokazala prisutnost insercijske sekvencije ispred ili iza gena.<sup>61</sup> Detekcija PCR-produkata obavljena je elektroforezom u agaroznom gelu s naknadnim bojenjem etidium bromidom. Vizualizacija produkata obavljala se pod UV transiluminatorom.

Amplikoni su bili pročišćeni na kolonama (*Qiagen Purification Kit*) i zatim sekvencionirani s obje strane u Eurofin servisu (Ebersberg, Njemačka). Sekvencije nukleotida i aminokiselina koje proizlaze iz njih analizirane su s pomoću programa Blast na stranici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Identifikacija mutacija u *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> i *bla*<sub>CTX</sub> genima bazirana je na: Bush K, Jacoby GA. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β-lactamases. Lahey Clinic; 2002. Dostupno na <http://www.lahey.org/studies/>.

#### Karakterizacija plazmida

Plazmidi su ekstrahirani *Qiagen Mini Kitom* (Inel, Medicinska tehnika) prema uputama proizvođača i podvrgnuti multipleksnom PCR-u za određivanje inkompatibilne grupe prema Carattoli i sur.<sup>62</sup>

## Rezultati

#### Osjetljivost na antibiotike

Svi su izolati pokazivali rezistenciju na amoksicilin, cefoksitin i cefuroksim, što je posljedica prirodne rezistencije na te antibiotike kao što je prikazano u tablici 1. Visoke stope rezistencije opažene su i kod gentamicina (77%) i ceftazidima (65%). Niske stope rezistencije imali su imipenem (12%) i meropenem (7%) (tablica 2.). Najučinkovitiji antibiotik s obzirom na MIK<sub>90</sub> bio je meropenem (2 mg), a slijedi imipenem (4 mg/L) kao što je prikazano u tablici 2. S obzirom na fenotip rezistencije, 14 izolata pripadalo je grupi 1, dok su 44 svrstana u grupu 4 prema Apfalter i sur. koja obuhvaća dereprimiranu AmpC-β-laktamazu i ESBL.

#### Fenotipski testovi za detekciju β-laktamaza

Metoda kombiniranih diskova s klavulanskom kiselinom dala je pozitivan rezultat u 44 soja, što je upućivalo na produkciju ESBL-a, a to je dokazano i na temelju sniženja MIK-a cefotaksima u prisutnosti klavulanske kiseline za najmanje tri razrjeđenja (8 puta). Test indukcije bio je negativan u svim izolatima. Test kombiniranih diskova s fenilboroničnom kiselinom dao je pozitivan rezultat u svim izolatima, što je upućivalo na pojačanu ekspresiju AmpC-β-laktamaze.

Tablica 1. Osetljivost na antibiotike (MIK u  $\mu\text{g/mL}$ ), tip plazmida, frekvencija konjugacija s prenesenim markerima rezistencije i sadržaj  $\beta$ -laktamaza izolata *Enterobacter cloacae*  
 Table 1. Antibiotic susceptibility (MICs in  $\mu\text{g/ml}$ ), frequency of conjugation with cotransferred resistance markers and  $\beta$ -lactamase content of *Enterobacter cloacae* isolates

Broj No	Godina Year	Uzorak Specimen	Centar Center	AMX	TZP	CXM	CAZ	CTX	CTX/CL	CRO	FEP	FOX	IMI	MEM	GM	CIP	PBRT	FC/CRM	$\beta$ -laktamaza geni $\beta$ -lactamase genes
1	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	32	$\geq 128$	2	$\geq 128$	32	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	32	8	L/M, Y	$3 \times 10^7$ TE, GM, SMX, C, AN	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC <i>bla</i> <sub>TEM-1P</sub>
2	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	2	$\geq 128$	32	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	64	8	Neg.	$1,2 \times 10^7$ TE, GM, SMX, C	DR ampC
3	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	2	$\geq 128$	16	8	$\leq 0,06$	4	2	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	8	0,25	L/M, Y	$3 \times 10^8$ TE, GM, SMX, C	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
4	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	0,25	$\geq 128$	32	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	32	4	L/M	Neg.	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
5	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	64	$\geq 128$	0,25	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	32	8	H12, Y	$1,5 \times 10^7$ TE, GM, SMX, C, AN	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
6	2009.	Obrisak kamile Canilla swab	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\geq 128$	64	1	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	16	4	Neg.	$2 \times 10^7$ TE, GM, SMX, C, AN	DR ampC
7	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	32	$\geq 128$	4	$\geq 128$	4	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	64	8	L/M	Neg.	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
8	2009.	Obrisak traheje Tracheal swab	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	8	$\geq 128$	2	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	32	8	L/M, Y	$2 \times 10^7$ TE, GM, SMX, C, AN	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
9	2009.	Obrisak rane Wound swab	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	32	$\geq 128$	4	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	2	4	Neg.	$7 \times 10^7$ TE	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
10	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\geq 128$	32	0,25	64	32	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	32	4	Neg.	Neg.	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
11	2009.	Krv Blood	Rijeka	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	16	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	1	$\leq 0,06$	$\geq 128$	0,5 (16)	Neg.	Neg.	DR ampC
12	2009.	Urin Urine	Rijeka	$\geq 128$	4	$\geq 128$	32	2	$\leq 0,06$	2	1	$\geq 128$	0,12	$\leq 0,06$	4	0,06	Neg.	$1,6 \times 10^6$ TE, GM	DR ampC
13	2009.	Obrisak rane Wound swab	Dubrovnik	$\geq 128$	4	$\geq 128$	4	32	$\geq 128$	$\geq 128$	32	$\geq 128$	0,5	$\leq 0,06$	0,12	0,06	Neg.	Neg.	DR ampC
14	2009.	Urin Urine	Dubrovnik	$\geq 128$	64	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	1	$\leq 0,06$	16	0,06	Neg.	Neg.	DR ampC
15	2008.	Urin Urine	Dubrovnik	$\geq 128$	2	32	$\geq 128$	32	8	$\geq 128$	4	0,5	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	Neg.	$1,2 \times 10^5$ TE, GM	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
16	2009.	Urin Urine	Dubrovnik	$\geq 128$	$\geq 128$	64	64	$\geq 128$	32	$\geq 128$	16	0,5	$\leq 0,06$	$\geq 128$	2	$\geq 128$	Y, FIC	$3,3 \times 10^5$ TE, GM	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
17	2009.	Urin Urine	Dubrovnik	$\geq 128$	8	64	1	$\geq 128$	16	$\geq 128$	16	0,5	$\leq 0,06$	0,25	2	$\geq 128$	Neg.	$1 \times 10^3$ TE	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
18	2009.	Obrisak rane Wound swab	Split	$\geq 128$	8	32	0,5	32	8	$\geq 128$	16	0,5	$\leq 0,06$	32	0,25	$\geq 128$	FIC	NT	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC
19	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	64	$\geq 128$	0,5	$\geq 128$	16	$\geq 128$	32	0,5	$\leq 0,06$	8	0,25	$\geq 128$	L/M, FIC	Neg.	ISEpl <i>bla</i> <sub>CTX-M15S</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1P</sub> -DR ampC

Tablica 1. *Nastavak*

Broj No	Godina Year	Uzorak Specimen	Centar Center	AMX	TZP	CXM	CAZ	CTX	CTX/CL	CRO	FEP	FOX	IMI	MEM	GM	CIP	PBRT	FC/CRM	$\beta$ -laktamaza geni $\beta$ -lactamase genes
20	2009.	Punktat trbuha Abdominal aspirate	Split	$\geq 128$	32	64	0,5	$\geq 128$	32	$\geq 128$	32	0,5	$\leq 0,06$	32	$\leq 0,06$	$\geq 128$	H12	Neg.	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>OXA-10</sub> DR ampC
21	2009.	Obrisak nosa Nose swab	Dubrovnik	$\geq 128$	0,5	64	4	$\geq 128$	16	$\geq 128$	16	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	8	$\leq 0,06$	$\geq 128$	H12	$6 \times 10^8$ TE	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> bla <sub>OXA-10</sub> DR ampC
22	2009.	Obrisak rane Wound swab	Dubrovnik	$\geq 128$	8	64	$\leq 0,06$	16	8	$\geq 128$	64	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	128	1	$\geq 128$	Neg.	$1,5 \times 10^6$ C, SMX, TMP, TE, GM	DR ampC
23	2009.	Krv Blood	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	8	$\geq 128$	16	$\geq 128$	32	0,5	$\leq 0,06$	2	0,5	$\geq 128$	H12	$1 \times 10^6$ C, SMX, TMP, TE, GM	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> bla <sub>SHV-10</sub> DR ampC
24	2009.	Aspirat drene Drain aspirate	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	32	64	32	16	$\geq 128$	64	0,5	$\leq 0,06$	128	0,25	$\geq 128$	H12	Neg.	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> bla <sub>OXA-10</sub> DR ampC
25	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	$\geq 128$	16	$\geq 128$	8	$\geq 128$	8	1	$\leq 0,06$	16	0,5	$\geq 128$	H12	$2 \times 10^7$ TE	IS26bla <sub>CTX-M-3</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
26	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	32	2	64	8	$\geq 128$	8	0,5	$\leq 0,06$	32	0,5	$\geq 128$	H12	$2 \times 10^7$ TE	IS26bla <sub>CTX-M-3</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
27	2009.	Obrisak rektuma Rectal swab	Split	$\geq 128$	16	64	4	$\geq 128$	16	$\geq 128$	16	0,5	$\leq 0,06$	16	1	$\geq 128$	H12	$3 \times 10^7$ C, SMX, TMP, TE, GM	IS26bla <sub>CTX-M-3</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
28	2009.	Obrisak rektuma Rectal swab	Split	$\geq 128$	16	$\geq 128$	16	32	16	$\geq 128$	32	1	$\leq 0,06$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	H12	$5 \times 10^5$ TE	IS26bla <sub>CTX-M-3</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
29	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Split	$\geq 128$	8	16	2	32	16	$\geq 128$	8	0,25	$\leq 0,06$	16	0,5	$\geq 128$	H12	$2 \times 10^7$ TE	IS26bla <sub>CTX-M-3</sub> bla <sub>TEM-10</sub> derDKrept ampC
30	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	16	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	4	$\geq 128$	Neg.	NT	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
31	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Zagreb	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	0,25	$\leq 0,06$	$\geq 128$	Neg.	NT	DR ampC
32	2009.	Aspirat bronha Bronchial aspirate	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	Neg.	NT	DR ampC
33	2009.	Sputum	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	128	1	1	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	Neg.	NT	DR ampC
34	2009.	Sputum	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	16	$\geq 128$	8	$\geq 128$	32	0,25	$\leq 0,06$	32	4	Neg.	NT	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> bla <sub>SHV-10</sub> DR ampC
35	2009.	Sputum	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	32	$\geq 128$	32	$\geq 128$	8	$\geq 128$	32	0,25	$\leq 0,06$	32	4	Neg.	NT	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-10</sub> DR ampC
36	2010.	Urin Urine	Rijeka	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	1	$\geq 128$	64	0,25	$\leq 0,06$	$\geq 128$	32	Neg.	NT	DR ampC
37	2010.	Urin Urine	Rijeka	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	$\geq 128$	1	$\geq 128$	64	0,25	$\leq 0,06$	$\geq 128$	32	Neg.	NT	DR ampC
38	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	32	64	2	$\geq 128$	16	$\geq 128$	32	0,5	$\leq 0,06$	64	16	Neg.	Neg.	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>OXA-10</sub> DR ampC
39	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	32	64	2	$\geq 128$	4	$\geq 128$	16	0,12	$\leq 0,06$	32	8	L/M	$5 \times 10^5$ TE	ISEpl bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>OXA-10</sub> DR ampC

Tablica 1. Nastavak

Broj No	Godina Year	Uzorak Specimen	Centar Center	AMX	TZP	CXM	CAZ	CTX	CTX/CL	CRO	FEP	FOX	IMI	MEM	GM	CIP	PBRT	FC/CRM	$\beta$ -laktamaza geni $\beta$ -lactamase genes
40	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	16	32	4	$\geq 128$	8	$\geq 128$	16	0,25	$\leq 0,06$	0,5	$\leq 0,06$	L/M	$1 \times 10^{-6}$ TE	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> DR ampC
41	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	16	64	2	32	4	$\geq 128$	16	0,25	$\leq 0,06$	64	4	L/M	Neg.	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
42	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	8	32	2	32	8	$\geq 128$	64	0,5	$\leq 0,06$	0,12	4	L/M	$7 \times 10^{-3}$	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> DR ampC
43	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	32	64	8	0,06	8	1	$\geq 128$	8	0,25	$\leq 0,06$	0,5	$\leq 0,06$	L/M	0	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>OXA-11</sub> DR ampC
44	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	8	64	1	16	4	$\geq 128$	16	0,25	$\leq 0,06$	32	4	L/M	$5 \times 10^{-5}$ 0	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
45	2010.	Urin Urine	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	0,12	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$> 128$	32	8	$\geq 128$	$\geq 128$	A/C	Neg.	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> bla <sub>OXA-11</sub> DR ampC, bla <sub>VIM-1</sub>
46	2009.	Obrisak rane Wound swab	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	32	$\geq 128$	0,06	$\geq 128$	4	$\geq 128$	8	0,12	$\leq 0,06$	32	0,5	HI2	Neg.	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>OXA-11</sub> DR ampC
47	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	0,12	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	16	2	$\leq 0,06$	0,5	$\leq 0,06$	HI2	Neg.	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> DR ampC
48	2009.	Punktat abdominalna Abdominal aspirate	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	32	$\geq 128$	0,06	$\geq 128$	2	$\geq 128$	8	4	$\leq 0,06$	$\geq 128$	0,5	Neg.	$5 \times 10^{-5}$ 0	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> DR ampC
49	2009.	Obrisak rektuma Rectal swab	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	64	64	0,12	64	64	$\geq 128$	16	8	$\leq 0,06$	$\geq 128$	4	Neg.	$2 \times 10^{-5}$ TE, GM, SMX, C, AN	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
50	2009.	Vrh katetera Catheter tip	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	0,12	64	64	$\geq 128$	16	8	$\leq 0,06$	$\geq 128$	4	Neg.	$2 \times 10^{-5}$ TE	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
51	2010.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	2	$\geq 128$	8	0,5	$\leq 0,06$	32	$\leq 0,06$	L/M	$0,8 \times 10^{-5}$ C, SMX, TMP, TE, GM	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
52	2009.	Urin Urine	Split	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\geq 128$	4	$\geq 128$	32	0,12	$\leq 0,06$	$\geq 128$	$\geq 128$	Y	$0,28 \times 10^{-5}$ C, SMX, TMP, TE	ISEpI bla <sub>CTX-M15</sub> bla <sub>TEM-11</sub> DR ampC
53	2010.	Hrana Food	Zenica	$\geq 128$	16	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	16	$\geq 128$	4	$\geq 128$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	0,25	$\leq 0,06$	Neg.	NT	DR ampC
54	2010.	Hrana Food	Zenica	$\geq 128$	16	$\geq 128$	16	4	8	$\geq 128$	4	$\geq 128$	1	$\leq 0,06$	0,25	$\leq 0,06$	Neg.	NT	DR ampC
55	2011.	Urin Urine	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$> 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	4	32	32	0,25	A/C	NT	bla <sub>VIM-1</sub> bla <sub>TEM-11</sub> bla <sub>TX-M15</sub>
56	2011.	Urin Urine	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	8	32	$\geq 128$	32	A/C	NT	bla <sub>VIM-1</sub> bla <sub>TEM-11</sub> bla <sub>TX-M15</sub>
57	2011.	Urin Urine	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	64	$\geq 128$	1	2	64	2	A/C	NT	bla <sub>VIM-1</sub> bla <sub>TEM-11</sub> bla <sub>TX-M15</sub>
58	2010.	Urin Urine	Zagreb	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	16	16	64	16	A/C	NT	bla <sub>VIM-1</sub> bla <sub>TEM-11</sub> bla <sub>TX-M15</sub>

Kratice / Abbreviations: PBRT / PBRT-PCR – tip replikona temeljen na PCR-u / based replicon type; AMX – amoksisicilin / amoxicillin; TZP – piperacilin/tazobaktam / piperacillin/tazobactam; CXM – cefuroksim / cefuroxime; CAZ – ceftazidim / ceftazidime; CTX – cefotaksim / cefotaxime, CTX/CL – cefotaksim/klavulamska kiselina / cefotaxime/clavulamic acid; CRO – ceftriakson / ceftriaxone; FEP – cefepim / ceftaxime / cefepime; FOX – cefoksit / cefoxitin; IMI – imipenem / imipenem; MEM – meropenem / meropenem; GM – gentamicin / gentamicin; CIP – ciprofloksacin / ciprofloxacin; FC/CRM – frekvencija konjugacije/prenosi markeri rezistencije / frequency of conjugation/transfered resistance markers; TE – tetra-ciklin / tetracycline; SMX – sulfametoksazol / sulphamethoxazole; C – kloramfenikol / chloramphenicol; AN – amikacin; TMP – trimetoprim / trimethoprim; NT – nije testirano / not tested; DR – dereprimirana / derepressed

Tablica 2. Kumulativne vrijednosti MIK-ova i stope rezistentnih sojeva za različite antibiotike  
Table 2. Cumulative MIC values and the percentage of resistant strains for different antibiotics

Antibiotik Antibiotic	MIK raspon MIC range	MIK50 MIC50	MIK90 MIC90	Stopa rezistencije Number and percentage of resistant strains
Amoksicilin / Amoxicillin	> 256	> 256	> 256	100% (58/58)
Amoksicilin/ klavulanska / Amoxicillin/ clavulanate	> 256	> 256	> 256	100% (58/58)
Piperacilin / Piperacillin	> 256	> 256	> 256	100% (58/58)
Piperacilin/ tazobaktam / Piperacillin/ tazobactam	2 – > 256	16	128	15,5% (9/58)
Ceftazidim / Ceftazidime	0,5 – > 256	32	> 256	38/58 (65,5%)
Cefotaksim / Cefotaxime	0,06 – > 256	32	256	38% (22/58)
Cefotaksim/ klavulanska / Cefotaxime/ clavulanate	0,06 – > 256	2	128	24% (14/58)
Ceftriakson ceftriaxone	2 – > 256	128	> 256	79% (46/58)
Cefepim / Cefepime	1 – > 256	16	> 256	38% (22/58)
Cefoksitin / Cefoxitin	> 256	> 256	> 256	100% (58/58)
Imipenem / Imipenem	0,06 – 16	0,25	4	12% (7/58)
Meropenem / Meropenem	0,06 – 32	< 0,06	2	7% (4/58)
Gentamicin / Gentamicin	0,12 – > 256	32	256	77% (45/58)
Ciprofloksacin / Ciprofloxacin	0,06 – 128	2	21	46% (27/58)

### Konjugacija

Dvadeset i osam od 58 izolata prenijelo je rezistenciju na ceftazidim na recipijentni soj *E. coli* uz frekvenciju od  $10^{-8}$  do  $10^{-5}$ . Pet je sojeva uz rezistenciju na ceftazidim prenijelo i rezistenciju na sulfametoksazol/trimetoprim, kloramfenikol, gentamicin, tetraciklin i amikacin, četiri na sulfametoksazol/trimetoprim, kloramfenikol, gentamicin i tetraciklin, tri na tetraciklin i gentamicin, tri na tetraciklin, kloramfenikol, sulfametoksazol/trimetoprim i kloramfenikol te deset samo na tetraciklin.

### Karakterizacija $\beta$ -laktamaza

Dominantan tip ESBL-a bio je CTX-M-15 nađen u 37 izolata, dok je CTX-M-3-alelska varijanta nađena u pet sojeva. TEM-1- $\beta$ -laktamaza širokog spektra identificirana je kao dodatna  $\beta$ -laktamaza u 33 soja koja su imala CTX-M-15- $\beta$ -laktamazu. Metodom PCR-mapiranja utvrđeno je da su CTX-M-15-pozitivni sojevi imali insercijsku sekvenciju *ISEcp1* ispred *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-gena, dok su sojevi pozitivni na CTX-M-3 imali IS26-insercijsku sekvenciju ispred *bla*<sub>CTX-M-3</sub>-gena. U četiri izolata iz KBC-a Zagreb iz 2011. godine dokazana je produkcija VIM-1- $\beta$ -laktamaze uz dodatnu CTX-M-15 i TEM-1.

### Detekcija gena rezistencije na fluorokinolone

*Qnr*-geni nisu nađeni ni u jednom izolatu.

### Karakterizacija plazmida

Dominantna inkompatibilna grupa plazmida bila je IncL/M identificirana u 13 izolata, nakon čega slijedi IncHI2 u 12 izolata, IncY u šest i IncA/C s pet izolata te IncFIC u dva soja. Plazmid iz IncL/M-grupe kodirao je također CTX-M-15 i VIM-1- $\beta$ -laktamazu.

### Rasprava

Istraživanje je pokazalo dominaciju  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra iz porodice CTX-M u kombinaciji s derepresijom AmpC- $\beta$ -laktamaze kao dominantan mehanizam rezistencije na cefalosporine proširenog spektra. CTX-M- $\beta$ -laktamaze dobro hidroliziraju cefotaksim i ceftriakson, a native su ESBL za razliku od TEM i SHV- $\beta$ -laktamaza; prema bibliografskim podacima češće su u izvanbolničkih izolata, posebno urinarnih.<sup>63-64</sup> Naše je istraživanje potvrdilo njihovu dominaciju i u hospitalnim sojevima enterobaktera. CTX-M-15 pokazala se kao dominantna alelska varijanta CTX-M- $\beta$ -laktamaza u izolatima enterobaktera. Taj tip ESBL-a potječe iz Indije i proširen je diljem svijeta.<sup>64,65</sup> Za razliku od većine ostalih tipova CTX-M- $\beta$ -laktamaza uspješno hidrolizira i ceftazidim, što je vidljivo iz visokih vrijednosti MIK-a za ceftazidim.<sup>66</sup> U Hrvatskoj je CTX-M-15 opisana prethodno u izolatima *E. coli* iz KBC-a Zagreb, a i kao dodatna  $\beta$ -laktamaza u sojevima pozitivnim na MBL.<sup>67,68</sup> Identificirana je i u izolatima *Providencia* spp. iz KBC-a Split.<sup>69</sup> CTX-M-3 opisana je u izolatima iz KBC-a Split,<sup>67,70</sup> a kasnije također u izvanbolničkim izolatima *K. pneumoniae* iz Zagrebačke županije.<sup>71</sup> Prisutnost insercijskih sekvencija IS26 ispred *bla*<sub>CTX-M-3</sub>-gena i *ISEcp1* ispred *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-gena pojačava ekspresiju gena i stupanj rezistencije te ima ulogu u mobilizaciji i prijenosu gena.<sup>65</sup> To bi mogao biti mehanizam odgovoran za širenje CTX-M-15-beta-laktamaze diljem Hrvatske i među različitim vrstama enterobakterija. Plazmidna lokacija gena omogućuje širenje *bla*<sub>ESBL</sub>-gena konjugacijom. S obzirom na to da je u većine sojeva plazmid koji kodira ESBL sadržavao i gene rezistencije na aminoglikozide, kloramfenikol, tetracikline, sulfonamide i trimetoprim, moguće je da je osim selekcijskog učinka cefalosporina i primjena drugih antibiotika, posebice aminoglikozida, potaknula diseminaciju tih plazmida. Hiperekspresija kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze otežava detekciju ESBL-a u enterobaktera pa je metoda kombiniranih diskova izvedena na podlozi s dodatkom kloksacilina koji inhibira AmpC- $\beta$ -laktamazu. Rezistencija na ko-amoksiklav u enterobaktera posljedica je produkcije kromosomske AmpC- $\beta$ -laktamaze, a česta je i u ESBL-pozitivnih enterobakterija ako se  $\beta$ -laktamaze stvaraju u većim količinama. Piperacilin/tazobaktam pokazivao je aktivnost u 85% sojeva, što je posljedica bolje inhibicije CTX-M- $\beta$ -laktamaza tazobaktamom u odnosu prema klavulanskoj kiselini i jače intrinzične aktivnosti piperacilina prema enterobakteru u odnosu prema amoksicilinu. Rezistencija na aminoglikozide utvrđena u gotovo 80% izolata vrlo je česta u ESBL-pozitivnih sojeva zbog smještaja gena rezistencije na aminoglikozide na istom plazmidu kao i *bla*<sub>ESBL</sub>-gen.<sup>72,73</sup> Nije bilo velikih razlika u fenotipu rezistencije između izolata iz različitih centara. Plazmidi koji su kodirali CTX-M-15- $\beta$ -laktamazu pripadali su u IncL/M, HI2, Y i FIC za razliku od onih identificiranih u CTX-M-pozitivnim izolatima *E. coli* koji su uvršteni u FIIs i FIA inkompatibilnu



grupu.<sup>67</sup> VIM-1-pozitivni izolati imali su plazmid Inc L/M-grupe, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima.<sup>21,32</sup> Plazmidi iz Inc L/M-grupe sadržavali su i gene koji kodiraju ESBL i metalo- $\beta$ -laktamaze, što pokazuje da isti plazmidi mogu akvirirati različite gene rezistencije. U izolatima iz KBC-a Zagreb zapažena je u posljednjoj godini istraživanja (2010.) pojava prvih metalo- $\beta$ -laktamaza iz VIM-serije, što pokazuje evoluciju rezistencije na cefalosporine proširenog spektra od dereprimiranih AmpC- $\beta$ -laktamaza i ESBL-a na početku istraživanja do karbapenemaza na njegovu kraju. Epidemijsko pojavljivanje metalo- $\beta$ -laktamaza u enterobaktera u KBC-u Zagreb primijećeno je 2012. kada je počeo i sustav praćenja karbapenemske rezistencije u enterobakterija koji uključuje fenotipsku i molekularnu detekciju karbapenemaza.

Klinička su istraživanja pokazala da produkcija ESBL-a u enterobaktera utječe na lošiji klinički ishod u bolesnika koji imaju sepsu uzrokovanu tom bakterijom.<sup>74-75</sup> S obzirom na visoku stopu ESBL-a među enterobakterima rezistentnim na cefalosporine proširenog spektra, mikrobiološki laboratoriji trebali bi provoditi rutinsko testiranje na produkciju ESBL-a ne samo u *K. pneumoniae*, *E. coli* i *P. mirabilis* nego i u ostalih enterobakterija.

Dodatna su istraživanja potrebna za bolje razumijevanje epidemiologije i genetskog podrijetla  $\beta$ -laktamaza u enterobaktera, a sadašnji rezultati pokazuju prisutnost različitih mehanizama rezistencije u toga važnog hospitalnog patogena.

#### Zahvale

Zahvaljujemo dr. Sonji Marinković (KBC Zagreb), dr. Ivani Škrobonji (KBC Rijeka), dr. Niliji Volarević (Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije) i dr. Paulu Bohnertu (Zavod za zaštitu zdravlja Dubrovnik) na prikupljanju sojeva za istraživanje.

#### LITERATURA

- Kerr TJ, McHalle B. Applications in General Microbiology. A Laboratory Manual, 6. izd. Winston-Salem: Hunter Textbooks Inc; 2003.
- Lockhart SR, Abramson MA, Beckmann SE i sur. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli: causing infections in intensive care unit patient in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol* 2007;45:3352-9.
- Paterson DL. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* 2006;119:20-8.
- Kaye KS, Cosgrove S, Harris A, Eliopoulos GM, Carmeli Y. Risk factor for Risk factors for Emergence of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins among Enterobacter spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(9):2628-30.
- Andrašević S, Tambić-Andrašević A. Rezistencija uzročnika urogenitalnih infekcija na antibiotike. *Medicus* 2006;15:246-7.
- Livermoore D.  $\beta$ -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin Microb Rev* 1995;8(4):57-84.
- Jacoby AG. AmpC- $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82.
- Goethaert K, Van Looveren M, Lammens C i sur. High-dose cefepime as an alternative treatment for infections cause by TEM-24 ESBL producing Enterobacter aerogenes in severely ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:56-62.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. Minireview. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
- Bedenić B, Žagar Ž. Kliničko i laboratorijsko značenje inducibilnih beta-laktamaza. *Liječ Vjesn* 1995;117:249-53.
- Bedenić B.  $\beta$ -laktamaze u laboratoriju i njihova uloga u rezistenciji I. dio. *Liječ Vjesn* 2004;126:314-24.
- Bedenić B. Beta-laktamaze i njihova uloga u rezistenciji II. dio. *Liječ Vjesn* 2005;127:12-21.
- Fung-Tomc J, Gradelski E, Huczko E, Dougherty TJ, Kessler RE, Bonner DP. Differences in the resistant variants of Enterobacter cloacae selected by extended-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1289-93.
- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and Impact of Plasmid-Mediated Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;1:17-29.
- Jacoby GA, Munoz Price LS. The new  $\beta$ -lactamases. *N Eng J Med* 2005;352:380-91.
- Chanawong A, M'Zali F, Heritage J, Xiong JH, Hawkey MP. Three cefotaximes, CTX-M-9, CTX-M-13 and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:630-7.
- Arpin C, Dubois V, Coulangue L i sur. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in Community and Private Health Care Centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3506-14.
- Marchandin H, Godreuil S, Darbas H i sur. Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an Aeromonas clinical strain: Acquisition from the prevalent Enterobacter aerogenes clone in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;12:3994-5.
- Giakkoupi P, Tzouveleki L, Tsakris A, Loukova V, Sofinaou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A  $\beta$ -lactamase with extended-spectrum properties produced by an Enterobacter cloacae clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2247-53.
- Zurfluth K, Haechler H, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from rivers and Lakes in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:3021-26.
- Canton R, Akova M, Carmeli Y i sur.; the European Network on carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:413-31.
- Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase of Enterobacter cloacae and cloning of the gene into Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-46.
- Prottumarthy S, Moland ES, Jeretschko S, Swanzy R, Thomson KS, Fritsche TR. NMC-A carbapenem-hydrolyzing enzyme in Enterobacter cloacae in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9:999-1002.
- Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem hydrolyzing enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:776-8.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51.
- Lauretli L, Riccio ML, Mazzariol A i sur. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584-90.
- Jeong SK, Lee K, Chong Y i sur. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of Enterobacter cloacae. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:397-400.
- Miro E, Segura C, Navarro F i sur. Spread of plasmids containing the blaVIM-1 and blaCTX-M genes and the qnr determinants in Enterobacter cloacae, Klebsiella. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(4):661-5.
- Yan JJ, Ko WCK, Chuang C, Wu JJ. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 Enterobacter cloacae and first identification of VIM-2 in Citrobacter freundii. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:503-11.
- Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E i sur. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2125-8.
- Glupeczynski Y, Huang TD, Boucharouf W i sur. Rapid emergence and spread of OXA-48 producing enterobacteriaceae in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:168-72.
- Zujić-Atalić V, Bedenić B, Kocsis E i sur. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia – the results of the multicenter study. *Clin Microbiol Inf* 2014;20:894-903.
- Bedenić B, Zujić-Atalić V, Bogdan M i sur. Prvi opis karbapenemaze u Osječko-baranjskoj županiji u izolatu Enterobacter cloacae, osjetljivom na karbapeneme. *Liječ Vjesn* 2015;137:17-21.
- Novak A, Goić-Barišić I, Tambić-Andrašević A i sur. Monoclonal outbreak of VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacter cloacae in Intensive Care unit, University Hospital Center Split, Croatia. *Microb Drug Res* 2014; ePub ahead of print.
- Bejuk D, Novkovski M, Juranko V i sur. Prikaz rijetko viđenog oblika otpornosti na karbapeneme u vrste Enterobacter cloacae. *Liječ Vjesn* 2013;135:316-20.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved tenth edition. CLSI document M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

38. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2010. Twentieth informational supplement. (June 2010 update). CLSI document M100–S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
39. *Leclercq R, Canton R, Brown DFJ i sur*. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2011;1:1–20.
40. *Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB i sur*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
41. *Livermore DM, Brown DFJ*. Detection of  $\beta$ -lactamase mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:59–64.
42. *Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A*. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988;10:867–78.
43. *Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y*. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA-double-disk synergy test for differentiating metallo- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003;41:4623–9.
44. *Walsh TR, Bolmstrom A, Gales A*. Evaluation of new E test for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002;40:2755–8.
45. *Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A*. A sensitive screening test for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009;47:1631–9.
46. *Kim YK, Geung-Hong S, Moland ES, Thomson KS*. Convenient test using combination of chelating agents for detection of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2007;45:2798–801.
47. *Apfalter P, Assadian O, Daxbock F, Hirschl AM, Rotter M, Makristahis A*. Extended double disc synergy testing reveals a low prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacter* spp. in Vienna, Austria. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:854–9.
48. *Elwell LP, Falkow S*. The characterization of R plasmids and the detection of plasmid-specified genes. U: Lorian V, ur. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2. izd. Baltimore MD: Williams and Wilkins; 1986, str. 683–721.
49. *Nüesch-Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH*. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV  $\beta$ -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:398–402.
50. *Arlet G, Brami G, Decre D i sur*. Molecular characterization by PCR restriction fragment polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995;134:203–8.
51. *Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME i sur*. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:735–43.
52. *Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R i sur*. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* 2004;42:2523–9.
53. *Perez-Perez FJ, Hanson ND*. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153–62.
54. *Yigit H, Quennan 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.
55. *Naas T, Vandell W, Sougkoff W, Livermore DM, Nordmann P*. Cloning and sequence analysis of the gene for carbapenem hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, SME-1 from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262–70.
56. *Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA*. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis* 2011;17:103–6.
57. *Gulmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtag S, Metan G, Yakopogulklan Y*. Carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemase and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:523–6.
58. *Robiscek A, Jacoby GA, Hooper DC*. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006;6:629–40.
59. *Robiscek A, Strahilevitz J, Sahn DF, Jacoby GA, Hooper DC*. qnr prevalence in ceftazidim-resistant Enterobacteriaceae from United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2872–4.
60. *Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ*. Multiplex PCR for rapid detection of CTX-M  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:154–5.
61. *Saladin M, Cao VT, Lambert T i sur*. Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209:161–8.
62. *Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ*. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63:219–28.
63. *Bonnet R*. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1–14.
64. *Cantón R, Novais A, Valverde A i sur*. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:144–53.
65. *Coque TM, Novais A, Carattoli A i sur*. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 2008;14:195–7.
66. *Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M i sur*. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165–74.
67. *Literacka E, Bedenic B, Baraniak A i sur*. blaCTX-M genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new (blaCTX-M-3) and widely spread (blaCTX-M-3a, blaCTX-M-15) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1630–5.
68. *Zujic-Atalić V, Bedenić B, Kocis E i sur*. Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia – the results of the multicenter study. *Clin Microbiol Inf* 2014;20:894–903.
69. *Barl P, Bedenić B, Sardeli S, Uzunović-Kamberović S, Vraneš J, Plečko V*. Spread of CTX-M producing *Providencia* spp. causing urinary tract infections in the University Hospital Split, Croatia. *Med Glasn* 2012;9:317–24.
70. *Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I i sur*. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007;19:97–100.
71. *Bedenić B, Vraneš J, Bošnjak Z i sur*. Emergence of CTX-M group 1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in the community. *Med Glasn* 2010;7:32–9.
72. *Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Strachounski L*. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3724–32.
73. *Peymani A, Farivar TN, Samikhani R, Javadi A, Najafpour R*. Emergence of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum and class 1 integron among *Enterobacter cloacae* isolates collected from hospitals of Tehran and Qazvin, Iran. *Microb Drug Resist* 2014;20:424–30.
74. *Kim SJ, Park KH, Chung JW, Sung H, Choi S, Choi S*. Prevalence and impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in cancer patients with *Enterobacter* species bacteremia. *Korean J Intern Med* 2014;29:637–46.
75. *Leverstein-van Hall MA, Blok HEM, Paauw A i sur*. Extensive Hospital-Wide Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Clone, with Late Detection Due to a Variable Antibigram and Frequent Patient Transfer. *J Clin Microbiol* 2006;518–24.

