

ISSN 2744-1229

Dec 2021 Vol. 2



ZBORNIK RADOVA iz "Laboratorijske dijagnostike"

Komora medicinsko-laboratorijskih dijagnostičara FBiH



Glavni urednik

Doc. dr. sc. Amir Ibrahimagić

Redakcioni odbor

Alisa Prešić-Abduzaimović (BiH)

Sedina Omeragić (BiH)

Jasmina Kišija-Bajrić (BiH)

Jasminka Talapko (Hrvatska)

Sanela Hajro (BiH)

Berina Haračić (BiH)

Zijada Smailagić (BiH)

Mirjana Stupnišek (Hrvatska)

Esad Burgić (BiH)

Dženana Gušić (BiH)

Enver Ivanković (BiH)

Harisa Šido (BiH)

Ljiljana Benković (BiH)

Aida Mujičić (BiH)

Dženisa Čajić (BiH)

Magdalena Perić (Hrvatska)

Lejla Hasanbegović (BiH)

Lejla Tatlić (BiH)

Emina Muftić (BiH)

Amel Salkić (BiH)

Savka Petrić (BiH)

Emina Smajić (BiH)

Farah Kamberović (Španija)

Elma Salihović (BiH)

Vedina Kučuković (BiH)

Nemanja Jovičić (BiH)

Aleksandra Pašić (BiH)

Sekretar

Sanela Hajro

Zbornik radova Komore medicinsko-laboratorijskih dijagnostičara FBiH

Adresa Komore:

Čekaluša 90

71000 Sarajevo, BiH

Adresa predsjednika:

Fra Ivana Jukića 2

72000 Zenica, BiH

0038761/614-147

www.kmldfbih.ba

[E-mail: kmldfbih2020@gmail.com](mailto:kmldfbih2020@gmail.com)

Poštovane i uvažene kolegice i kolege,

Komora medicinsko - laboratorijskih dijagnostičara FBiH formirana je kao prva matična Komora diplomiranih inženjera medicinsko-laboratorijske dijagnostike još davne 2010. godine i danas okuplja preko 200 članova svih nivoa obrazovanja (od I ciklusa dipl. ing. MLD do III ciklusa Doktora nauka laboratorijske djelatnosti).

Studenti, članovi Komore, pa i članovi drugih komora i udruženja imaju priliku pisati, pokazati i predočiti svoja stručna i naučno – stručna djela. Zbornik obuhvata teme iz različitih laboratorijskih djelatnosti i to: biohemijsko-hematoloških, mikrobioloških, imunoloških, citoloških, patohistoloških, transfuzioloških, bromatoloških, veterinarskih i drugih djelatnosti.

Danas smo svjedoci jačanja i promovisanja digitalizacije radi situacije u kojoj se planeta Zemlja našla, te će nam prvi Zbornik iz laboratorijske dijagnostike biti poveznica informisanja svih inovativnih stručnih i naučno-stručnih zbivanja u zajednici.

SADRŽAJ

1. Metode određivanja otpornosti/osjetljivosti bakterija na antibiotike	
Lejla Tatlić 1
2. Multirezistentne bakterije	
Branka Bedenić 10
3. Fenotipske metode i njihov značaj u detekciji penicilin rezistentnog <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Lejla Osmanović 24
4. Antibiotička rezistencija kao rizik u prevenciji infekcija	
Rusmira Hasandić-Mehmedagić 50
5. Značaj praćenja sadržaja teških metala u vodi za piće i prehrambenim proizvodima	
Amra Salkić 62
6. Uputstvo za autore 76



METODE ODREĐIVANJA OTPORNOSTI/OSJETLJIVOSTI BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE

Lejla Tatlić

Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo, BiH

Sažetak

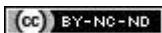
Antibiotici su jedni od najčešće upotrebljivanih lijekova koji baš zbog te činjenice stvaraju veliki problem u medicini. Njihova uspješnost u terapiji ugrožena je sve većim brojem bakterija koje postaju otporne na njihovo djelovanje. Prvi mehanizam rezistencije na antibiotike opisan je za penicilinazu, odnosno za enzim koji inaktivira penicilin njegovom razgradnjom. Danas je otkrivena rezistencija na svaki antibiotik, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim faktorima, ali ponajviše o potrošnji antibiotika. Zbog velike i česte rezistencije na antibiotike, prije liječenja određenog patogena mora se provesti ispitivanje na antimikrobnu osjetljivost. S tim u vezi razvile su se metode kojima se provodi i prati širenje rezistentnih bakterija. Antibiogram je izraz za metodu kojom se ispituje osjetljivost bakterija na antibiotike gdje sve imaju isti cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik. Poseban problem u liječenju infekcija stvaraju bakterije otporne na više antibiotika takozvane MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bakterije. One mogu biti intenzivno otporne na lijekove (XDR) ili panrezistentne (PDR). MDR bakterije najčešće nastaju stjecanjem ekstrakromosomskih elemenata od drugih bakterija u okolini. Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bolesti uzrokovane bakterijom, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. Pošto nije jedini problem rezistencija bakterija na antibiotike već i nedovoljan razvitak novih antibiotika kombiniranje informacija s do sada provedenih istraživanja moglo bi dovesti do pronalaska novih vrsta antibiotika. S tim dobivenim rezultatima i sa smjernicama propisanim od raznih organizacija (npr. EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), određuje se najbolja opcija liječenja.

1.UVOD

Antibiotici su jedni od najčešće upotrebljivanih lijekova koji baš zbog te činjenice stvaraju veliki problem u medicini. Njihova uspješnost u terapiji ugrožena je sve većim brojem bakterija koje postaju otporne na njihovo djelovanje. Povećanje stope rezistencije na antibiotike dovodi do niza problema kao što su povećanje morbiditeta odnosno oboljenja, smrtnosti, povećanih troškova liječenja, te samim time postaju jednim od najvećih globalnih prijetnji javnom zdravlju.

Autor za korespondenciju:

Lejla Tatlić, dipl. ing. MLD
Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo
Hamdije Kreševljakovic, 57
71000 Sarajevo
E-mail: ltatlic@bahceci.com





Prema izvješćima World Economic Forum Global Risks antibiotička otpornost predstavljena je kao jedna od najvećih prijetnji ljudima. Procjenjuje se da u Europi 25.000 ljudi umire svake godine kao rezultat bakterija otpornih na lijekove. Već sredinom 20. st. A. Fleming je najavio pojavu rezistencije na penicilin kada je početkom 40-ih godina 20. stoljeća uveo penicilin u kliničku praksu.

Prvi mehanizam rezistencije na antibiotike opisan je za penicilinazu, odnosno za enzim koji inaktivira penicilin njegovom razgradnjom. Danas je otkrivena rezistencija na svaki antibiotik, a brzina nastanka te otpornosti ovisi o različitim faktorima, ali ponajviše o potrošnji antibiotika. Njegovoj prisutnosti i aktivnosti prvi su izvijestili Abraham i Lanac 1940. godine neposredno nakon njegova otkrića. Antibiotici ne razlikuju patogene bakterije od nepatogenih bakterija normalne flore, time dolazi do nakupljanja odnosno skladištenja gena rezistencije u prirodi. Takve rezistentne bakterije postaje teško ili nemoguće liječiti. Problem je najočitiji u bolničkoj flori, gdje terapijski postupci pospješuju razvoj infekcija, a široka upotreba antibiotika pospješuje širenje rezistentnih bakterijskih sojeva. U bolničkoj flori dominira MRSA, enterobakterije otporne na III. generaciju cefalosporina i pseudomonasi rezistentni na karbapanem. MRSA i *Escherichia coli* (koja producira β laktamaze proširenoga spektra) uzrokuju i izvanbolničke infekcije. Postoje dvije vrste rezistencije koja može biti urođena ili stečena preko mutacija u kromosomskim genima i prijenosom horizontalnim genom. Primarna (intrinzična), te sekundarna ili stečena preko mutacija u kromosomskim genima i prijenosom horizontalnim genom. Primarna (urođena ili intrinzična) rezistencija.

Primarna rezistencija na određeni antibiotik je sposobnost bakterije da se na temelju svojih strukturalnih ili funkcionalnih karakteristika odupre djelovanju antibiotika.

Primarna rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika: antibiotici uskog (užeg) spektra se prepisuju kada je poznato koja bakterija je prisutna, jer su djelotvorni protiv specifičnih vrsta bakterija; antibiotici šireg (širokog) spektra djeluju na više vrsta bakterija stoga se prepisuju kada se ne zna koja je točno bakterija uzrokovala bolest. Sekundarna rezistencija kada mikroorganizam stekne rezistenciju na neki određeni antibiotik koji je prije na njega djelovao aktivno javlja se tzv. sekundarna rezistencija (1,2,8,9,13).

2. METODE ISTRAŽIVANJA

Zbog velike i česte rezistencije na antibiotike, prije liječenja određenog patogena mora se provesti ispitivanje na antimikrobnu osjetljivost. S tim u vezi razvile su se metode kojima se provodi i prati širenje rezistentnih bakterija. Antibiogram je izraz za metodu kojom se ispituje osjetljivost bakterija na antibiotike gdje sve imaju isti cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik.

Metode testiranja osjetljivosti na antibiotike su:

- Metoda razrjeđivanja
- Disk-difuzijska metoda
- E-test
- Automatizovana metoda
- Testovi specifični za mehanizam rezistencije
- Genotipske metode kao što su PCR i DNA hibridizacijske metode (1,2).



Dilucioni metod

Postoje dvije varijante ovog metoda — agar dilucioni i bujon dilucioni — mada se drugi primjenjuje češće. U epruvetama sa hranljivim bujonom napravi se niz razblaženja (serijski, tako da svaka sljedeća epruveta ima duplo manju koncentraciju) antibiotika, a zatim se u njih doda ista količina ispitivanih bakterija. Nakon inkubacije vizuelno se određuje da li je došlo do inhibicije rasta mikroorganizama.

Koncentracija antibiotika u prvoj epruveti u kojoj nema zamućenja (nema prirasta bakterija) odgovara minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK). Za određivanje minimalne baktericidne (mikrobicidne) koncentracije, vrši se presijavanje iz preostalih epruveta bez zamućenja i prve sa zamućenjem na čvrstu hranljivu podlogu pa nakon inkubacije traži prirast kolonija. Prvi izostanak kolonija odgovara minimalnoj baktericidnoj (mikrobicidnoj) koncentraciji (MBK ili MMK). Odnos MBK i MIK je značajan parametar osetljivosti bakterijskog soja. Visoko tolerantnim sojevima označavaju se oni kod kojih je ovaj odnos veći od 32 (1,3,8).

Disk-difuziona metoda ispitivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike

Zasniva se na principu difuzije antibiotika kroz čvrstu hranljivu podlogu (agar) najčešće Mueller-Hinton prethodno zasijanu ispitivanom bakterijskom kulturom. *Disk metoda* (metoda tablete) to je najčešće primjenjena metoda. Upotrebljavaju se diskovi ili tablete obloženi tačno određenom vrstom i koncentracijom antibakterijskog lijeka,

koja je odgovarajuća onoj koja se postiže u organizmu primjenom terapijskih doza tog lijeka. Sam postupak izvodimo tako što

- Iz čiste bakterijske kulture uzimamo kolonija ezom.
- Pravimo suspenziju određene gustine od ispitivane bakterijske kulture.
- Bris natopimo suspenzijom bakterija i ocijedimo višak tečnosti lakim pritiskom o zidove epruvete.
- Ravnomerno nanosimo bakterijske suspenzije brisem na cijelu površinu agara (najčešće Mueller-Hinton) da bise dobio konfluentan porast.

Poslije nanošenja suspenzije na podlogu vrši se stavljanje diskova sa određenim (standardnim) koncentracijama antibiotika pincetom. Postoji tačno određen raspored diskova sa antibioticima. Inkubacija u termostatu je od 16 do 24 h na temperaturi 37°C. Poslije inkubacije vrši se očitavanje prečnika zone inhibicije (1,3,11,12,13).

Ako su svi uslovi standardizovani (pritisak, temperatura, pH, vrijeme inkubacije) onda je prečnik zone inhibicije proporcionalan koncentraciji datog antibakterijskog sredstva.

U toku inkubacije dolazi do umnožavanja bakterija na hranjivoj podlozi. Antibiotik difunduje kroz hranjivu podlogu. Koncentracija antibiotika postepeno i radijalno opada sa udaljavanjem od diska sve do tačke gdje više nije inhibitorna i gdje se pojavljuje porast bakterija. Nastaje zona inhibicije rasta. Zona inhibicije rasta: okrugla zona oko diska sa



antibiotikom u kojoj nema vidljivog porasta bakterija. Mjerenjem njenog prečnika tumačimo dobivene rezultate.

Tumačenje rezultata disk –difuzionog metoda, Postoje 3 kategorije osjetljivosti: S/osjetljiv - vjerovatnoća uspjeha terapije je visoka nakon primjene uobičajenih doza antibiotika, datih na uobičajen način. I/intermedijarno - (umjereno) - osjetljiv-mogući uspjeh terapije ako se antibiotik da u maksimalnim koncentracijama i parenteralnim

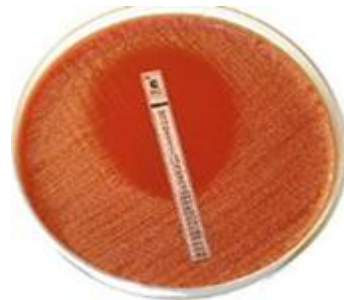
R/rezistentan - nikada se ne primjenjuje u terapiji; bez obzira na dozu, terapija je vjerovatno neuspješna.

Na zonu inhibicije mogu da utiču sljedeći faktori: osobine podloge, veličina inokuluma, faza razmnožavanja u kojoj se nalazi ispitivana bakterija, stabilnost antibakterijskog sredstva. Da bi se otklonio utjecaj ovih faktora za izvođenje ANTIBIOGRAMA koristi se standardna Mueller-Hintonova podloga (1,3,12,13).

Epsilon test ili E test

E test je kvantitativni metod za određivanje antimikrobne osjetljivosti, odnosno minimalne inhibitorne koncentracije MIK-a antibiotika. E test predstavlja kombinaciju difuzionog i dilucionog metoda. Pored sličnosti sa difuzionom metodom, razlikuje se od nje po preformiranom i stabilnom koncentracionom gradijentu antibiotika. Epsilon test se takođe izvodi na čvrstoj podlozi i zasniva na difuziji antibiotika kroz medijum. Za izvođenje se koriste posebne, komercijalno dostupne plastične trake koje sadrže neravnomerno impregniran antibiotik

čija koncentracija eksponencijalno opada duž trake. Jedna strana trake je kalibrisana sa MIK skalom u $\mu\text{g/ml}$ i to od 0,002-1024 $\mu\text{g/ml}$ zavisno od antibiotika. Nakon inkubacije je uočljiva elipsoidna zona inhibicije rasta, a minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) se očitava sa skale u presjeku užeg segmenta zone i same trake. Vrijednost na traci u presjeku sa zonom inhibicije rasta odgovara MIK. Rezultat se takođe očitava kao S-osjetljiv, I-intermedijarno osjetljiv i R-rezistentan uz MIK u $\mu\text{g/m}$ (1,3,4).



Slika 1. Tehnika očitavanja E-testa

Automatizovane metode

Osiguravaju pripremljene i oblikovane ploče za mikrodiluciju, instrumentaciju i automatsko očitavanje ploča. Većina takvih automatiziranih sistema za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike osigurava i automatsku inokulaciju, čitanje te tumačenje.

Identifikacija bakterija se vrši automatskim sistemom. Koristi se automatizovani sistem npr. VITEK Compact, koji omogućava identifikaciju više od 330 vrsta mikroorganizama. Identifikacija se završi vrlo brzo, u toku pet sati, što omogućava pravovremenu dijagnozu. Uz identifikaciju određuje se i osjetljivost na antimikrobna sredstva što sa vrijednostima MIK-a, omogućava



kliničarima odabira najadekvatnijeg antibiotskog tretmana

Pri odredjivanju antibiograma na VITEK Compact aparatu: očitavanje rezultata vrši se automatski uz pomoć Expert sistema za validaciju testa osjetljivosti postoji mogućnost identifikacije potencijalnih mehanizama rezistencije, čak i „emerging“ i niskog niva rezistencije. Takođe doprinosi otkrivanju nozokomijalnih infekcija. Velika im je prednost ovih metoda što su brze, ali velika je mana što su skupe.(1,10)

Testovi specifični za mehanizam rezistencije

Testovi specifični za mehanizam rezistencije se obavljaju na temelju otkrivenog prisutnog mehanizma rezistencije. Kao što se detekcija beta laktamaza može provesti upotrebom kromogenog testa cefalosporinaze. Sposobnost izvjesnih bakterija da stvaraju enzime koji inaktiviraju antibiotike sa β -laktamom, tj. peniciline i cefalosporine. U najčešće korišćene kliničke procedure spadaju jodometrijska metoda, acidometrijska metoda i mnoštvo različitih hromogenih podloga. Jodometrijski i acidometrijski testovi se generalno izvode sa penicilinom kao podlogom pa, iz tog razloga, mogu da otkriju samo one enzime koji hidrolizuju penicilin.

Jedan od hromogenih cefalosporina, PADAC (Calbiochem-Behring), pokazao se kao efektivan u otkrivanju većine poznatih β -laktamaza osim nekih penicilinaza koje stvaraju stafilokoke i nekih β -laktamaza koje stvaraju anaerobne bakterije. Još jedan hromogeni cefalosporin, npr. nitrocefim

(Glaxo Research), pokazao se kao efikasan u otkrivanju svih poznatih β -laktamaza uključujući i penicilinaze stafilokoka. U svrhu testa koriste se Cefinase diskovi natopljeni nitrocefinom. Kod ovog jedinjenja vidljiva je vrlo brza promjena žute boje u crvenu prilikom hidrolize amidne veze u β -laktamskom prstenu β -laktamazom. Kada bakterija proizvodi ovaj enzim u značajnim količinama, žuti disk pocrveni tamo gdje je izolat nanešen (1,7).

Genotipske metode

Genotipske metode-podrazumijevaju utvrđivanje prisustva gena za rezistenciju na antibiotike.

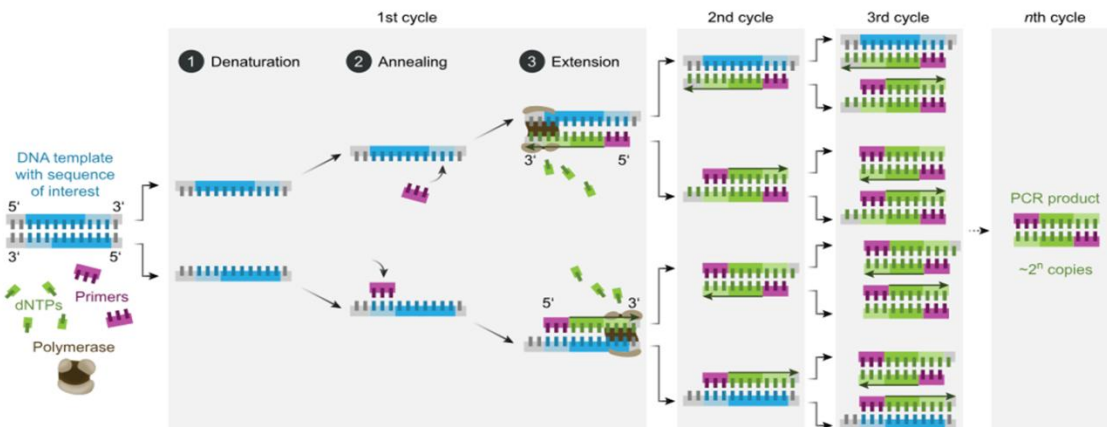
Ukoliko je MIC vrijednost za neki soj mikroorganizma iznad postavljenih graničnih vrijednosti, neophodno je dalje ispitivanje prirode rezistencije, kako bi se utvrdilo da li je rezistencija urođena ili stečena. Urođena rezistencija je specifičnost vrste ili roda i tačna identifikacija taksonomske pripadnosti ispitivanog soja predstavlja osnovni preduslov za utvrđivanje genetske baze rezistencije. Genetska baza rezistencije utvrđuje se molekularno-biološkim metodama od kojih je najčešće korišćena PCR tehnika i DNA hibridizacija.

PCR je jedna od najčešće upotrebljivanih molekularnih tehnika za detekciju određene DNA sekvence. U tu je tehniku uključeno nekoliko ciklusa denaturacije uzorka DNA, vezivanje specifičnih početnica na ciljne sekvence, i produživanje tih sekvenci olakšano termostabilnim polimerazama dovodeći do replikacije i duplikacije DNA sekvenci.



PCR je ciklična reakcija amplifikacije specifičnog regiona DNK molekula. Ona omogućava da se od male početne količine DNK dobije veliki broj kopija njenog željenog fragmenta koje se potom mogu detektovati. Osim određivanja prisustva patogena u uzorku (kvalitativna analiza) PCR analizom se može precizno i pouzdano odrediti i količina patogena u uzorku (kvantitativna analiza). Najpreciznija kvantitativna analiza se dobija primjenom real-time PCR metode (qPCR). Za razliku od klasičnog PCRa gdje se količina patogena određuje na kraju reakcije (end point analiza) kod qPCR se količina patogena određuje u realnom vremenu nakon svakog ciklusa tokom reakcije, primjenom fluorescentnih markera (fluorescentnih boja ili DNK proba sa fluoroforama). Analiza qPCR metodom pruža mogućnost da se osim detektovanja prisustva patogena određivanjem njegove količine u uzorku dobiju i informacije o stepenu infekcije i stadijumu bolesti kao i da se prati odgovor na terapiju.

DNA hibridizacija je fenomen u kojem se jednostruki polulanci molekula dezoksiribo-nukleinske kiseline (DNK) ili ribonukleinske kiseline (RNK) različitog porijekla međusobno ostvaruju komplementarne veze, stvarajući kombiniranu DNK ili RNK. DNK hibridizacija općenito se odnosi na molekularno-genetičku tehniku kojom se mjeri stepen genetičke sličnosti između kompariranih fondova DNK sekvenci. Pritom se obično određuje međusobna genetička distanca organizama i/ili populacija. DNA hibridizacija temelji se na specifičnim parovima purina i pirimidina u DNA. Stoga se lanac radioaktivno označen s poznatim slijedom baza može spariti sa denaturanom DNA iz uzorka. Pojavom ove hibridizacije lanac se označava sa signalnim radioaktivnim izotopom ili enzimom, a ukoliko nema ciljne sekvence ili izolat ne sadrži specifični gen ne dolazi do otkrivanja signala. DNK hibridizacije je zlatni standard za razlikovanje bakterijskih vrsta, kada vrijednost sličnosti manja od 70%



Shka 2. Shematski prikaz PCR metode



ukazuje da poređeni sojevi pripadaju posebnim vrstama. Iako je PCR najčešće korišćena metoda za dokazivanje gena rezistencije, ona zahtjeva izolaciju bakterija i njihove DNK i zavisna je od kulturnih tehnika i njihovih ograničenja pri izolaciji bakterija, zbog čega se za ispitivanje rezistencije unapređuju i razvijaju najsavremenije, kulturalno nezavisne tehnike poput metagenomike i sekvencioniranja cijelog genoma. Ove metode omogućuju detekciju i ispitivanje cjelokupnog bakterijskog genoma, identifikaciju novih genetskih osobina i identifikaciju nepoznatih genetskih elemenata, što upotrebom samog PCR metoda nije moguće (1,5,6).

3. ZAKLJUČAK

Poseban problem u liječenju infekcija stvaraju bakterije otporne na više antibiotika takozvane MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bakterije. One mogu biti intenzivno otporne na lijekove (XDR) ili panrezistentne (PDR). MDR bakterije najčešće nastaju stjecanjem ekstrakromosomskih elemenata od drugih bakterija u okolini. Za otkrivanje najboljeg načina liječenja bolesti uzrokovane bakterijom, trebaju se provesti ispitivanja antimikrobne osjetljivosti i utemeljiti koja vrsta bakterije uzrokuje bolest. Pošto nije jedini problem rezistencija bakterija na antibiotike već i nedovoljan razvitak novih antibiotika kombiniranje informacija s do sada provedenih istraživanja moglo bi dovesti do pronalaska novih vrsta antibiotika. S tim dobivenim rezultatima i sa smjernicama propisanim od raznih organizacija (npr. EUCAST - Europski odbor za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti), određuje se najbolja opcija liječenja (1,15).

4. LITERATURA

1. Musa M. Mehanizmi stjecanja otpornosti na antibiotike kod bakterija, Završni rad, Osijek 2017.
2. Tambić Andrašević. Otpornost bakterija na antibiotike - vodeći problem medicine u 21. Stoljeću, Medicina, 43 (2007), 7-14.
3. Hukić M i saradnici, Bakteriologija, Sarajevo 2005, 115-119.
4. https://en-m-wikipedia-org.translate.google.com/wiki/Etest?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=bs&_x_tr_hl=bs&_x_tr_pto=sc
5. https://www.researchgate.net/publication/325606136_METODE_ZA_ODREDIVANJE_ANTIMIKROBNE_REZISTENCIJE_KOD_MIKROORGANIZAMA_U_HRANI
6. https://bs.wikipedia.org/wiki/DNK-DNK_hibridizacija
7. [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8800801\(0604\)_SR.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8800801(0604)_SR.pdf)
8. https://sr.wikipedia.org/sr-el/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%94%D0%B8%D0%BB%D1%83%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%B8_%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4
9. Payerl-Pal M. Potrošnja antibiotika u hrvatskim bolnicama, Infektološki glasnik, 29 (2009), 157-164.
10. http://www.ukctuzla.ba/ukctuzla/?page_id=552&lang=bs
11. <https://dokumen.tips/documents/disk-difuziona-metoda-ispitivanja-osjetljivosti-bakterija-na-antibiotike.html>
12. Kalenić S. The resistance of bacteria to antibiotics, Medicus, 9 (2000), 149-153.



13. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2013.
14. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome, *Science*, 311 (2006), 374–377.
15. Znidarčić Ž. Medicinska etika 2, Centar za bioetiku ZAGREB, 2006.
16. <https://drgermophile.files.wordpress.com/2020/06/image-17.png?w=624> –slika dilucionog metoda
17. <https://html.scribdassets.com/2puoy3t rr43jbg7y/images/7-c72b74184e.png> - očitavanje rezistencije
18. <https://html.scribdassets.com/2puoy3t rr43jbg7y/images/3-b366723497.png> - slika agara
19. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1024px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png - PCR
20. <https://www.bionet-skola.com/w/images/3/39/NUCLEIC.gif> - DNK HIBRIDIZACIJA



METHODS FOR DETERMINING THE RESISTANCE/SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA TO ANTIBIOTICS

Tatlić L.

ABSTRACT

Antibiotics are one of the most commonly used drugs, which is a major problem in medicine due to this fact. Their success in therapy is threatened by the growing number of bacteria that are becoming resistant to their action. The first mechanism of antibiotic resistance is described for penicillinase, ie the enzyme that inactivates penicillin by its degradation. Today, resistance to each antibiotic has been discovered, and the rate of onset of this resistance depends on various factors, but mostly on antibiotic consumption. Due to the high and frequent resistance to antibiotics, an antimicrobial susceptibility test must be performed before treating a particular pathogen. In this regard, methods have been developed to implement and monitor the spread of resistant bacteria. An antibiogram is a term for a method that tests the susceptibility of bacteria to antibiotics where they all have the same goal of predicting whether the bacteria will react to the antibiotic applied. A special problem in the treatment of infections is created by bacteria resistant to several antibiotics, the so-called MDR (MULTIPLE DRUG RESISTANCE) bacteria. They can be intensive drug resistant (XDR) or panresistant (PDR). MDR bacteria are most often formed by acquiring extrachromosomal elements from other bacteria in the environment. To identify the best way to treat a disease caused by a bacterium, antimicrobial susceptibility testing should be conducted and to establish which type of bacterium is causing the disease. Since the only problem is not the resistance of bacteria to antibiotics, but also the insufficient development of new antibiotics, combining information with research conducted so far could lead to the discovery of new types of antibiotics. With these results and with guidelines prescribed by various organizations (eg EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing), the best treatment option is determined.

Corresponding author:

Lejla Tatlić
Bahceci BIH IVF centar, Sarajevo
Hamdije Kreševljakovic, 57
71000 Sarajevo
E-mail: ltatic@bahceci.com



MULTIREZISTENTNE BAKTERIJE

Branka Bedenić

Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, KBC Rebro, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

Sažetak

U najvažnije multirezistentne bakterije koje predstavljaju terapijski problem ubrajamo enterobakterije pozitivne na β -laktamaze proširenog spektra (ESBL), plazmidne AmpC β -laktamaze i karbapenemaze, karbapenemaza pozitivni *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*, penicilin-rezistentni *Streptococcus pneumoniae* te vankomicin-rezistentni enterokok. β -laktamaze proširenog spektra razgrađuju oksimino cefalosporine i aztreonam, najčešće se pojavljuju u izolatima enterobakterija, a kodirane su na prenosivim plazmidima koji često sadržavaju i gene rezistencije na ne- β -laktamske antibiotike. Plazmidne AmpC β -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena na plazmid enterobakterija. Te β -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije β -laktama i inhibitora β -laktamaza.

Enterobakterije mogu razviti rezistenciju na karbapeneme uslijed hiperprodukcije β -laktamaza proširenog spektra ili plazmidnih AmpC β -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane ili zbog produkcije karbapenemaza iz grupe A (KPC, IMI, NMC, SME), B (metalo- β -laktamaza iz VIM, IMP i NDM serije) ili D (OXA-48 β -laktamaze). Karbapenemaze koje se nalaze u *Acinetobacter* spp. pripadaju molekularnoj klasi A (KPC), B (VIM, IMP, SIM, NDM) ili D (OXA enzimi). Najčešći mehanizam rezistencije na karbapeneme je produkcija OXA-enzima, ali i drugi mehanizmi su često uključeni, poput gubitka porina vanjske membrane ili pojačane aktivnosti efluks pumpi. Rezistencija na karbapeneme u *P. aeruginosa* nastaje najčešće zbog produkcije metalo- β -laktamaza iz VIM, IMP, GIM, SPM i NDM serije, gubitka porina vanjske membrane ili pojačane aktivnosti MexAB ili MexCD pumpi. U *S. aureus* rezistencija na meticilin nastaje zbog stjecanja mecA gena koji kodira penicilin vežući protein PBP2a. Ekspresija PBP2a dovodi do rezistencije na sve β -laktame uključujući cefalosporine (s izuzetkom ceftarolina ili ceftobiprola) i karbapeneme. Pneumokoki rezistentni na penicilin vrlo su često rezistentni i na cefalosporine te antibiotike iz drugih skupina pa predstavljaju terapijski problem u invazivnim infekcijama. Najvažniji problem u enterokokoka je pojava rezistencije na vankomicin.

Autor za korespondenciju:

Prof. dr. sc. Branka Bedenić
Katedra za medicinsku mikrobiologiju i
parazitologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u
Zagrebu
Klinički zavod za kliničku i
molekularnu mikrobiologiju
KBC-Zagreb
Tel: +385 23 67 304
e-mail: branka.bedenic@kbc-zagreb.hr

1.UVOD

Plazmidna rezistencija na cefalosporine proširenog spektra predstavlja veliki klinički problem. β -laktamaze proširenog spektra razgrađuju oksimino cefalosporine i aztreonam, najčešće se pojavljuju u izolatima enterobakterija, a kodirane su na prenosivim plazmidima koji često sadržavaju i gene rezistencije na ne- β -laktamske antibiotike (1). Mutacije mijenjaju strukturu aktivnog središta tako



da velike molekule kao što su oksimino-cefalosporini mogu ući u aktivno središte i biti hidrolizirani. Nastale su mutacijama od TEM-1, TEM-2 i SHV-1 β -laktamaze. Osjetljive su na inhibiciju klavulanskom kiselinom, sulbaktamom i tazobaktamom (2).

Prva β -laktamaza proširenog spektra bila je SHV-2 β -laktamaza opisana u izolatu *K. oxytoca* u Njemačkoj 1983. godine. Nakon toga su se bakterije pozitivne na ESBL proširile prvo po Europi, a zatim i po ostalim kontinentima. Najčešće se nalaze među hospitalnim izolatima *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli*, a u novije vrijeme i u izvanbolničkih pacijenata (2). Dije se u tri velike porodice: TEM, SHV i CTX-M. TEM i SHV β -laktamaze proširenog spektra se najčešće javljaju u hospitalnim izolatima dok su CTX-M β -laktamaze češće u izvanbolničkoj populaciji. TEM i SHV β -laktamaze nastaju od parentalnih TEM-1, TEM-21 i SHV-1 β -laktamaza mutacijama koje mijenjaju konfiguraciju aktivnog središta i šire spektar djelovanja enzima (2). Za razliku od njih CTX-M β -laktamaze su nativne ESBL, a nastale su od kromosomskih β -laktamaza vrste *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana* (3). Prva CTX-M β -laktamaza bila je CTX-M-1 opisana u Njemačkoj 1995. godine („cefotaximase-Munich“). Dije se u pet grupa: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (4). CTX-M β -laktamaze su dominantan tip ESBL u mnogim zemljama kao što su Švicarska, Austrija, Grčka, Poljska, Japan, Tajvan, Argentina i Kina (4, 5). Postoje i rjeđe vrste β -laktamaza proširenog spektra kao što su PER, VEB i IBC β -laktamaze (6). Geni koji kodiraju ESBL su locirani na prenosivim plazmidima koji često sadržavaju gene

rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotičke kao što su aminoglikozidi, tetraciklini, fluorokinoloni, sulfonamidi i trimetoprim. Bakterije producenti ESBL su česti uzročnici epidemija hospitalnih infekcija (7-11) koje se teško kontroliraju i liječe jer su multiplo-rezistentne na većinu antibiotika osim karbapenema pa oni predstavljaju terapijski izbor (12).

Plazmidne AmpC β -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena na plazmid enterobakterija. Te β -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije penicilina i inhibitora β -laktamaza (13, 14).

Plazmidne AmpC β -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena bakterija iz roda *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter* na plazmid što omogućuje daljni prijenos tog gena između bakterija istih ili različitih vrsta. Te β -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije penicilina i inhibitora β -laktamaza. Ne djeluju na cefalosporine četvrte generacije i karbapeneme koji se mogu dati u terapiji i invazivnih infekcija (14).

Enterobakterije mogu razviti rezistenciju na karbapeneme uslijed hiperprodukcije β -laktamaza proširenog spektra ili plazmidnih AmpC β -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane ili zbog produkcije karbapenemaza iz grupe A (KPC, IMI, NMC SME), B (metalo- β -laktamaza iz VIM, IMP i NDM serije) ili D (OXA-48 β -laktamaze). Najčešći mehanizam rezistencije je produkcija karbapenemaza iz grupe A (KPC) ili klase B (VIM, IMP)



a u novije vrijeme sve veće značenje ima i klasa D (OXA-48) (15).

U klasi A se nalaze karbapenemaze koje su inhibirane klavulanskom kiselinom i sulbaktamom i pojavljuju se rijetko. Pripadaju u grupu 2f po K. Bush. Kodirane kromosomalno ili plazmidno. Najvažnije karbapenemaze iz grupe A su: SME-1, SME-2, SME-3 (*Serratia marcescens*) (16), IMI-1 (*Enterobacter cloacae*) (17), NMC-A (*E. cloacae*) (18) KPC-1, KPC-2, KPC-3 (*Klebsiella pneumoniae*) (19). Uzrokuju rezistenciju na: aminopeniciline, ureidopeniciline, starije cefalosporine (prva i druga gen.), aztreonam i imipenem (20). Vrlo slabo hidroliziraju meropenem osim KPC varijanti tako da ne uzrokuju klinički značajnu rezistenciju a također ne djeluju na cefamicine. KPC varijante su najčešće u *K. pneumoniae* ali su također opisane u *Enterobacter* spp i *Salmonella* spp. (21). KPC β -laktamaze za razliku od ostalih karbapenemaza iz grupe A imaju potencijal epidemijskog širenja i uzrokovanja hospitalnih epidemija budući da su kodirane na konjugativnim plazmidima.

Metallo β -laktamaze su klinički najznačajnije karbapenemaze. Karakterizira ih sposobnost hidrolize svih karbapenema i otpornost na komercijalno dostupne inhibitore ali osjetljivost na kelatore metalnih iona (20). Njihov supstratni spektar je vrlo širok; osim karbapenema hidroliziraju peniciline, cefalosporine ali ne djeluju na aztreonam (20). Mehanizam hidrolize ovisi o interakciji β -laktama i iona cinka u aktivnom središtu enzima što rezultira u posebnom svojstvu tih enzima da su osjetljivi na inhibiciju s EDTA,

kelatorom cinka i ostalih divalentnih kationa po čemu se razlikuju od svih ostalih β -laktamaza (20). Spadaju u više porodica a najznačajnije su one iz IMP, VIM, GIM i SPM serije a geni koji ih kodiraju se nalaze u integronima gdje su inkorporirane u genske kasete. One su se pojavile u čitavnom svijetu ali najviše izvještaja ima iz Europe, jugoistočne Azije i Japana. Hidrolitička aktivnost je inhibirana s metalnim kelatorima (EDTA). (MBL) mogu biti urođene, kromosomske i stečene odnosno prenosive (22).

Prenosiva rezistencija na imipenem je prvi puta opisana u izolatu *P. aeruginosa* u Japanu 1990. Nazvana je IMP-1 (active on imipenem) (23). IMP varijante su rijetke u enterobakterija. IMP-3 varijanta je opisana u Japanu 2000. godine u izolatu *Shigella flexneri*. To je bio prvi opis MBL u tipičnom izvanbolničkom izolatu (24). IMP-6 je prvi puta opisan u urinarnom izolatu *Serratia marcescens* u Japanu 2001 (25). IMP-8 varijanta je opisana u izolatu *Enterobacter cloacae* iz Tajvana (26).

Druga učestala porodica MBL su VIM enzimi. Hidroliziraju gotovo sve β -laktame osim aztreonama i mogu uzrokovati epidemije nozokomijalnih infekcija. (27). Prva VIM MBL (VIM-1) je izolirana iz *P. aeruginosa* izolata iz Verone 1997 (27). Ime dolazi od „Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase“. Njen supstratni profil koji uključuje sve β -laktame osim aztreonama. VIM-1 varijanta opisana i u izolatima *E. coli*, *K. pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* iz Grčke, *K. pneumoniae* i *P. stuartii* iz Francuske te *E. coli* i



K. pneumoniae iz Španjolske (15, 28, 29). VIM-2 β -laktamaza pronađena je u *C. freundii* (Tajvan) (26) i *E. cloacae* (Južna Koreja) (30). Ta alelska varijanta je proširena diljem svijeta. VIM-4 β -laktamaza je opisana u *K. pneumoniae* i *E. cloacae* izolatima u Italiji (31). VIM-12 je pronađen u izolatu *K. pneumoniae* u Grčkoj (32). Ta varijanta je kasnije opisana i u *E. coli* i *E. cloacae* također iz Grčke. VIM-19 β -laktamaza je opisana u izolatu *K. pneumoniae* iz Grčke u 2008. Soj je bio također pozitivan na KPC-2, CMY-2 i CTX-M-15 β -laktamazu (33). Soj je bio rezistentan na većinu antibiotika uključujući i kolistin, a osjetljiv samo na tigeciklin. Ista karbapenemaza opisana je u *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. stuartii* iz Alžira. Do sada je opisano 38 alelskih varijanti VIM MBL

<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>.

NDM je nova porodica MBL koje nisu srodne s ostalim porodicama. Enterobakterije koje produciraju NDM β -laktamaze predstavljaju veliki terapijski problem zbog toga što plazmidi koji sadržavaju bla_{NDM} gen mogu imati i do 14 determinanti rezistencije na antibiotike koji se mogu prenijeti konjugacijom na ostale bakterije što rezultira u multirezistentnom ili panrezistentnom fenotipu (34). Zasadu su NDM enzimi pronađeni samo u Enterobakterija, *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. U početku su NDM β -laktamaze bile ograničene na indijski subkontinent. Prvi NDM pozitivni izolat u Europi bio je opisan u Švedskoj od bolesnika koji je dobio infekciju uzrokovanu bakterijom *K. pneumoniae* u Indiji krajem 2007 (35). Nakon 2008. ima sve više izvještaja o prijenosu

NDM-1 pozitivnih enterobakterija iz Indije u Europu, SAD, Kanadu, Aziju i Australiju koji se obično događa putovanjem bolesnika a opisano su i slučajevi koji vuku porijeklo iz Balkanske regije. Mnogi od bolesnika iz Europe, sjeverne Amerike, Aziji i Australije imaju u anamnezi put ili boravak u Indiji ili Pakistanu a vrlo često se radi o bolesnicima koji su tamo bili hospitalizirani ili su primali medicinsku skrb (36, 37). Mnogi bolesnici koji su se vratili iz Indije su imale crijevnu kolonizaciju s bla_{NDM-1} producirajućim bakterijama što upućuje na zaključak da se bla_{NDM} -pozitivne bakterije nalaze u pitkoj vodi ili otpadnim vodama u Indiji.

U skupini D u enterobakterija je opisana OXA-48 beta-laktamaza. OXA-48 β -laktamaza uzrokuje rezistenciju na karbapeneme u *K. pneumoniae* a najčešće se javlja u Turskoj (38, 39) iako postoje izvještaji i iz Njemačke i Belgije (40). Stečena rezistencija na karbapeneme je donedavno bila relativno rijetka u enterobakterija.

U SAD-u dominiraju karbapenemaze iz grupe A i opisani su izolati *S. marcescens* sa smanjenom osjetljivošću na karbapeneme (41, 42), *E. cloacae* pozitivni na NMC-1 β -laktamazu (16) i *K. pneumoniae* pozitivni na KPC β -laktamaze (19), a u Kanadi je opisana NDM-1 β -laktamaza (36). U Francuskoj također dominiraju karbapenemaze iz grupe A kao što je IMI-1 β -laktamaza (17) opisana u *E. cloacae*, te *K. pneumoniae* pozitivna na OXA-48 koja spada u grupu D (43). Za razliku od SAD-a i Francuske u Grčkoj dominiraju metalo- β -laktamaze iz VIM serije u izolatima *E. cloacae* i *K. pneumoniae* (28, 29, 33, 44), ali je opisana i KPC-2



β -laktamaza u izolatu *K. pneumoniae* (45) i *Salmonella* spp (21). OXA-48 β -laktamaza je dominantan tip karbapenemaze u izolatima *K. pneumoniae* u Turskoj (38, 39) dok u Izraelu i Ujedinjenom Kraljevstvu prevladavaju KPC-2 i KPC-3 tipovi također u *K. pneumoniae* (46, 47). KPC pozitivni izolati *K. pneumoniae* su također opisani i u Austriji (37), Švicarskoj (48), Njemačkoj (49), Belgiji (42) i Italiji (50). Na Dalekom istoku postoje izvještaji o pojavi KPC i NDM β -laktamaza u enterobakterija (51). U Grčkoj, Njemačkoj i Kini su opisani sojevi sa simultanom produkcijom KPC i MBL (33, 49, 51).

Rezistencija na fluorokinolone u enterobakterija nastaje zbog mutacija kromosomskih *gyrA* i *parC* gena kao i zbog akvizicije plazmidnih *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* i *qnrS* gena. *Qnr* geni kodiraju *qnr* protein koji štiti topoizomerazu, bakterijski enzim neophodan za sintezu DNA. *Qnr* geni se često nalaze na plazmidima koji kodiraju produkciju beta-laktamaza proširenog spektra iz CTX-M porodice i metalo-beta-laktamaze (52).

U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da su domovi za starije i nemoćne važan rezervoar multirezistentnih bakterija (53, 54). Bolesnici u stacionarima domova su često prethodno boravili u bolnici gdje mogu biti kolonizirani multirezistentnim sojevima uključujući i takve koji proizvode karbapenemaze. Oni obično koloniziraju kronične bolesnike koji su prethodno dobivali višestruke terapije antibioticima ili su bili podvrgnuti invazivnim zahvatima u bolnicama. Infekcije uzrokovane karbapenemaza

producirajućim sojevima imaju veću stopu mortaliteta, i vezane su uz produženi boravak u bolnici i veće troškove liječenja. Za žohare je utvrđeno da mogu biti vektor ESBL pozitivnih sojeva ali ne postoje istraživanja o širenju karbapenemaza pozitivnih sojeva preko nožica žohara (55). Gram-negativne bakterije su ubikvitarne u prirodi i široko su rasprostranjene u zemlji i vodi gdje mogu preživjeti dugo vremena. Okolišne bakterije također mogu akvirirati gene rezistencije. Nedavna istraživanja su utvrdila sporadično pojavljivanje VIM-MBL i ESBL sojeva u jezerima i rijekama u Švicarskoj, Kini, Francuskoj, i SAD (56-59). Jezera i rijeke se smatraju posebno važnim kao mogući rezervoari multirezistentnih bakterija jer kupe površinske vode koje sadržavaju materijal različitog podrijetla kao što su vodene biljke, industrijske i poljoprivredne otpadne vode i kišnicu. Prevalencija ESBL sojeva u jezerima može biti i do 36% posebno u prenapučenim zemljama s razvijenom poljoprivredom i industrijom kao što su Kina, SAD i Francuska (57-59). ESBL i AmpC sojevi, posebno iz CTX-M i CMY porodice su pronađeni u životinja na farmama i kućnih ljubimaca (60-64).

Prva istraživanja provedena u Hrvatskoj iz devedesetih godina prošlog stoljeća su utvrdila dominaciju SHV-2 i SHV-5 beta-laktamaza proširenog spektra u hospitalnim izolatima enterobakterija u Hrvatskoj. Izolati su pokazivali visoki stupanj rezistencije na ceftazidim i aztreonam i bili su kodirani samoprenosivim plazmidima koji su sadržavali gene rezistencije na ne-beta-laktamske antibiotike (65-68). Kasnija



istraživanja iz 2000-tih su pokazala sve veći porast CTX-M beta-laktamazama u bolnicama i u izvanbolničkoj populaciji (69-71). Za razliku od prethodnih SHV varijanti pokazivali su visoki stupanj rezistencije na cefotaksim i ceftriakson kao i na većinu ne-beta-laktamskih antibiotika. CTX-M-15 je dominantan tip ESBL i u uzorcima kućnih ljubimaca (Matanović, neobjavljeni rezultati). Istraživanja karbapenemaza su započela od 2011. godine, a prva karbapenemaza opisana u enterobakterija u Hrvatskoj bila je KPC-2 koja spada u klasu A (68). Nakon nje je opisana NDM-1 također u kliničkom izolatu *K. pneumoniae* (72). To je dalo povod multicentričnom istraživanju u 2012. godini koje je provela također istraživačka skupina. Istraživanje je pokazalo dominaciju metalo-beta-laktamaza iz VIM serije. Nastavak tog istraživanja proveden u 2013. do 2014. godini je utvrdio također dominaciju metalo-beta-laktamaza iz VIM serije, ali i pojavu OXA-48 beta-laktamaze kao nove determinante rezistencije (73). Ta istraživanja su provedena u sklopu doktorskih disertacija čiji je mentor prijavitelj projekta. Navedena istraživanja karbapenemaza su obuhvaćala samo hospitalne izolate. U toku 2013. do 2014. su provedena istraživanja mehanizama rezistencije na karbapeneme u *A. baumannii* koji spada u nefermentativne bakterije u izolatima iz doma za starije i nemoćne i utvrđeno je postojanje dva klona; jednog pozitivnog na OXA-23 i drugog na OXA-24/40. OXA-23 pozitivni izolati su također producirali metalo-beta-laktamazu iz VIM klase (74). Istovremeno su prikupljeni izolati *P. mirabilis* iz iste ustanove u kojima je

identificirana CMY-16, plazmidna AmpC beta-laktamaza koja uzrokuje visoki stupanj rezistencije na cefalosporine treće generacije i cefoksitin ali ne djeluje cefepim i karbapeneme (73). U postupku objavljivanja je i rad u kojem su analizirani izolati *A. baumannii* iz kanalizacijske vode doma za starije i nemoćne. U nastavku istraživanja ispitivali bi mehanizme i putove širenja multirezistentnih enterobakterija između bolnica, domova i okoliša te ulogu insercijskih sekvenci u mobilizaciji bla gena. Jedan od ciljeva bi bio objasniti uzroke promjena u epidemiologiji multirezistentnih enterobakterija te prijelaz od SHV varijanti u devedestima prema CTX-M beta-laktamazama u 2000-tima te prijelaz od metalo-beta-laktamaza u 2012-2013 kao dominantnog mehanizma rezistencije prema OXA-48 koja danas dominira ne samo u bolnicama nego i u domovima za starije, a vjerojatno i u okolišu što još nije istraženo.

2. ZAKLJUČAK

Pojava karbapenem rezistentnih izolata enterobakterija i nefermentativnih bakterija predstavlja veliki izazov kliničarima u liječenju infekcija uzrokovanih multirezistentnim sojevima. Kolistin koji se smatra zadnjom terapijskom opcijom, također gubi djelotvornost zbog pojave kromosomske i plazmidne rezistencije uzrokovane širenjem plazmidnih *mcr* gena. Ceftazidim/avibaktam i ceftolozan /tazobaktam su novi antibiotici koji iskazuju dobar učinak



prema producentima karbapenemaza klase A i D ali ne djeluju na metalo-beta-laktamaze.

Osim vrlo limitiranih terapijskih opcija veliki problem predstavlja i otežana laboratorijska detekcija nekih karbapenemaza kao što je OXA-48 kod koje MIK-ovi karbapenema mogu biti varijabilni i vrlo često je izražena rezistencija samo na ertapenem. OXA-48 ne hidrolizira cefalosporine tako da su sojevi koji ju posjeduju osjetljivi na cefalosporine proširenog spektra ako ne postoji i dodatna ESBL. ESBL također predstavlja problem u laboratorijskoj detekciji kod nefermentativnih bakterija kao što je *P. aeruginosa* ili *A. baumannii* s obzirom da oni imaju izraženu ekspresiju kromosomske AmpC beta-laktamaze koja antagonizira sinergistički učinak s klavulanskom kiselinom tako da metoda dvostrukog diska ili metoda kombiniranih diskova koje uspješno detektiraju ESBL kod enterobakterija, u tih vrsta često daju lažno negativan rezultat.

3. LITERATURA

1. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Aug;33(8):1131-6.
2. Bradford PA: What's new in beta-lactamases? *Curr Infect Dis Resp* 2001A; 3(1):13-19.
3. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352:380-391.
4. Rossolini, GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect* 2008; 14(Suppl. 1):33-41.
5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1-14.
6. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(4):933-951.
7. Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G. Multiple CTX-M type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:4264-9.
8. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Beccera Z, Garza-Ramos U, Velazquez M, Miranda G, Leanos B, Solorzano F, Echaniz G. Outbreak of infections with extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. *J Clin Microbiol* 2001;39:3193-3196.



9. Gniadkowski M, Palucha A, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Warsaw, Poland; Clonal spread of the TEM-47 Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5 like ESBL-encoding gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3079-3085.
10. Shannon K, Stapleton P, Xiaoqin Xiang, Johnson A, Beattie H, El Bakri F, Cookson B, French G. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreak of infection in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 1998;36:3105-3110.
11. Arlet G, Sanson-le Pors MJ, Rouveau M, Fournier G, Marie O, Schlimmer B, Philipon A. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 β -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:797-803.
12. Essack SY: Treatment options for extended-spectrum β -lactamase producers. *FEMS Microbiol Lett* 2000;190:181-184.
13. Rahal JJ: Extended spectrum beta-lactamases: how big is the problem? *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(Suppl 2):2-6.
14. Tan TJ, Yong NG LS, Koh TK, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(1):146-149.
15. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-458.
16. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Pfaller A, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing group 2F β -lactamase (SME-2) in the United States: results from the Mystic program. *Diagn Microbiol Infect Dis*;2001;39:125-127.
17. Nordmann P, Mariotte s, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase of *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-946.
18. Pröttumathy 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.
19. Yigit H, Quennan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1151-1161.
20. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321-331.
21. Miriagou V, Tzouveleki LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo JF, Whichard JM. Imipenem resistance in *Salmonella* clinical isolate due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1297-1300.



22. Walsh T, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 2005;18 (2):306-325.
23. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:147-151.
24. Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, Haruta S, Sawai T, O'Hara K: Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase). *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44 (8):2023-2027.
25. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1343-1348.
26. Yan JJ, Ko WCK, Chuang C, Wu JJ. Metallo β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:503-511.
27. Lauretti L, M.L. Riccio, A. Mazzariol, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents. Chemother.*1999;43(7): 1584-1590.
- 28. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M. i sur.** VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003;41:3893-3896.
29. Galani I, Souli M, Chryssouli Z, Orlandou K, Giamarellou H. Characterization of a new integron containing *bla*_{VIM-1} and *aac*(6')-IIc in *an Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:634-638.
30. Jeong SK, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, Kim JM, Park KL, Han BH, Lee SW, Jeong TS. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:397-400.
31. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, et al. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:648-650.
32. Pournaras S, Ikonomidis A, Kristo I, Tsakris A, Maniatis AN. CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum β -lactamases in a tertiary Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2004;574-575.
33. Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I, Tsakris A. Detection of new metallo- β -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1604-1607.
34. Walsh T, Weeks J, Livermore D, Toleman A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:355-62.



35. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -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(12):5046-5054.
36. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerging Infect Dis* 2011;17:103-6.
37. Zarfel G, Hoenigl M, Wuerstl B, Leitner E, Salzer HJF, Valentin T, Posch J, Krause R, Grisold AJ. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Austria, 2001-2010. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:E5-E8.
38. Gulmez D, Woodford N, Palepou MF et al. Carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemase and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:523-526.
39. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48 persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54:101-106. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2872-4.
40. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Holdfelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(4):2125-2128.
41. Naas T, Vandell W, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for carbapenem hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1 from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262-1270.
42. Queenan AM, Shang W, Schreckenber P, Lolans K, Bush K, Quinn J, SME-3 a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 2006; 50:3485-3487.
43. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
44. Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis LS. i sur. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5153-5156.
45. Cuzon G, Naas T, Demachy MC, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;52:796-797.
46. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmely Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3026-3029.



47. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, MacDonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1261-1264.
48. Baboue B, Widmer AF, Dubuis Q, Ciardo D, Droz S, Betsch Y, et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3 producing *Klebsiella pneumoniae*, introduced to Switzerland 2009-2010. *Euro Surveillance* 2011;16(11): Epub
49. Steinmann I, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain KPC-2 and VIM-1 in a German University hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveillance* 2011;16(11):E pub.
50. Richter S, Frasson I, Bergo C, Parisi C, Cavallaro A, Palu G. Transfer of KPC-2 β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: The first case in Europe. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5):2040-2042.
51. Li B, Sun JY, Liu QZ, Han LZ, Huang XH, Ni YX. First report of *Klebsiella oxytoca* strains coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(6):2937-2941.
52. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. The world wide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006;6:629-40.
53. De Medina T, Carmeli Y: The pivotal role of long-term care facilities in the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* Another brick in the wall *Clin Infect Dis* 2010;50(12):1617-1618.
54. Sengstock DM, Thyagarajan R, Apalara J, Mira A, Chopra, T, Kaye KS. Mutlidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogen among older adults in community hospitals nad Nurisng homes. *Clin Infect Dis* 2010;50(12):1611-1616.
55. Cotton MF, Wasserman E, Pieper CH, Theron DC, Van tubberg D, Campbell G, Fang FC, Barnes J. Invasive disease due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. *J Hospit Infect* 2000;44:13-17.
56. Zurfluch H, Haechler H, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R.Characteristics of extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland). *Appl Environ Microbiol* 2012; 79(9):3021-6.
57. Chen H, Shu W, Chang X Chen J, Gou Y, Tan Y. The profle of antibiotic resistance and integorns of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolates from the Yangtze River basin Chonguing. *Environemental Pollut* 2010;158:2459-2464.
58. Aubron C, Poirel L, Ash JR, Nordmann P. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in US rivers. *Emerg Infect Dos* 2005;11:260-264.
59. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Novel class A carbapenem-hydrolyzing carbapenemase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:328-332.



60. 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.
61. Huber H, Zweifel C, Wittenbrink M, Stephan R. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 2013;162: 992–996.
62. Brinas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. β -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(10):3156-3163.
63. Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, Lopez C, Andreu A, Navarro F, Alfonso MP, Bou G, Blanco J, Liagoster M. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environmental Microbiol* 2010;76:2799.
64. Geser N, Stephan R, Haechler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res.* 2012;8:21.
65. Bedenić B, Žagar Ž. Extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Zagreb, Croatia. *Journal of Chemotherapy* 1998; 10(6):449-459.
66. Bedenić B, Randegger C, Stobberingh E, Haechler H. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in Zagreb, Croatia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001; 20:505-508.
67. Bedenić B, Schmidt H, Herold S, Monaco M, Plečko V, Kalenić S, Katić S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase in Dubrava University Hospital, Zagreb. *Journal of Chemotherapy* 2005;17(4):367-375.
68. Bedenić B, Vraneš J, Hofmann-Thiel S, Tonkić M, Novak A, Bučević-Popović V, Hoffmann H. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamases and determination of the virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children. *Wiener Klinische Wochenschrift* 2012; 124(5):504-515.
69. Tonkić M, Bedenić B, Goić-Barišić I, Katić S, Kalenić S, Kaufmann ME, Woodford N, Punda-Polić V. First report of CTX-M producing isolates from Croatia. *J Chemother* 2007; 19(1):97-100. CC, IF:0.92, cit:6.
70. Literacka E, Bedenić B, Baraniak A, Fiett J, Tonkić M, Jajić-Bencić I, Gniadkowski M. *bla*_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new (*bla*_{CTX-M-3}) and widely spread (*bla*_{CTX-M-3a}, *bla*_{CTX-M-15}) genetic structures. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1630-1635. IF:4.8, cit: 33.
71. Marijan T, Plečko V, Vraneš J, Džepina AM, Bedenić B, Kalenić S. Characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine of nonhospitalized patients in the Zagreb region. *Med Glas* 2010;7(1):46-53.cit 1.
72. Mazzariol A, Bošnjak Z, Ballarini P, Budimir A, Bedenić B, Kalenić S, Cornaglia G. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis.* 2012 Mar; 18(3): 532–534.



73. Bedenić B, Slade M, Žele-Starcevic L, Sardelic S, Vranic -Ladavac M, Bencic A, Zujic-Atalic V, Bogdan M, Bubonja-Šonje M, Tomić -Paradžik M, Tot T, Lukić -Grlić A, Drenjancevic D, Varda-Brkic D, Bandić -Pavlovic D, Mihaljević S, Zarfel G, Gužvinec M, Conzemius R, Barišić I, Tambić -Andrašević A. Epidemic spread of OXA-48 beta-lactamase in Croatia. *J Med Microbiol* 2018; 67; 8: 1031-1041.
74. Bedenić B, Bader N, Godič-Torkar K, Vranić-Ladavac M, Luxner J, Veir Z, Grisold AJ, Zarfel G. Nursing home as reservoir of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist* 2015; 21(3):270-278.



MULTIRESISTANT BACTERIA

Bedenić B.

ABSTRACT

The most important multiresistant bacteria causing treatment failures are extended-spectrum β -lactamase and/or plasmid-mediated ampC β -lactamase positive Enterobacteriaceae, carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. Extended-spectrum β -lactamases-producing hydrolyze oxyiminocephalosporins and aztreonam, are mostly produced by Enterobacteriaceae, and are encoded on transferable plasmids which often contain resistance genes to non- β -lactam antibiotics. Plasmid-mediated AmpC β -lactamases descend from the chromosomal ampC gene transferred to the plasmid. Those β -lactamases confer resistance to first, second and third generation of cephalosporins, monobactams, and to β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. Enterobacteriaceae may develop resistance to carbapenems due to the hyperproduction of ESBLs or plasmid-mediated AmpC β -lactamases in combination with porin loss or due to the production of carbapenemases of class A (KPC, IMI, NMC, SME), B (metallo- β -lactamases from VIM, IMP or NDM series), and D (OXA-48 β -lactamase). Carbapenemases found in *Acinetobacter* spp. belong to molecular class A (KPC), B (metallo- β -lactamases of IMP, VIM, NDM or SIM family) and D (OXA enzymes). The most frequent mechanism of carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. is through the production of OXA-enzymes but other various mechanisms including decreased permeability and efflux pump overexpression could also be involved. Carbapenem-resistance in *P. aeruginosa* is usually mediated by the production of metallo- β -lactamases of IMP, VIM, GIM, SPM or NDM series, loss of OprD outer membrane protein and/or upregulation of MexAB or MexCD efflux pumps. Methicillin-resistance in *S. aureus* occurs as the result of the acquisition of mecA gene that encodes novel PBP2a protein. Expression of PBP2a renders bacteria resistant to all β -lactams including cephalosporins (with the exception of ceftaroline and ceftobiprole) and carbapenems. Most strains of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* are often resistant to cephalosporins, and antibiotics from other classes, presenting a serious problem in treating invasive infections. The most important therapeutic problem in enterococci is development of resistance to vancomycin

Corresponding author:

***Branka Bedenić, MD, PhD, full professor
Clinical Department for Clinical and
Molecular Microbiology
University Hospital Centre Zagreb
University of Zagreb School of Medicine
e-mail: branka.bedenic@kbc-zagreb.hr
tel. +385 23 67 304***



FENOTIPSKE METODE I NJIHOV ZNAČAJ U DETEKCIJI PENICILIN REZISTENTNOG *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Lejla Osmanović
Klinički centar univerziteta u Sarajevu

Sažetak

Streptococcus pneumoniae pretežno izaziva infekcije gornjih respiratornih puteva (sinuzitis, otitis) i konjunktivitis. Vodeći je uzročnik vanbolničkih pneumonija, bakterijskog meningitisa i sepse.

Rezistencija na penicilin posredovana je u pneumokoka promjenom ciljnog mjesta. Ciljno mjesto za penicilin su tzv. penicilin vežući proteini ili prema engleskom "penicilin binding proteins" (PBP). Pneumokoki posjeduju šest takvih molekula: 1A, 1B, 2A, 2B, 2X i 3, a rezistentni sojevi imaju promijenjene PBP molekule koje pokazuju smanjeni afinitet za penicilin. Do promjene PBP molekula dolazi zbog izrazite sklonosti pneumokoka genetskoj transformaciji tj. ugrađivanju strane DNA iz okoline u svoj genom. Strana DNA potječe od viridans streptokoka s kojima pneumokoki dijele stanište na sluznici gornjih dišnih puteva. Cilj ovog rada je bio da ispita učestalost izolata *Streptococcus pneumoniae* rezistentnih na penicilin te prikažu i kompariraju fenotipske metode detekcije rezistencije na penicilin kod pneumokoka. Istraživanje je rađeno na osnovu podataka o pacijentima uzetih u periodu od 01.01.2016 do 01.01.2017 u OJ Klinička Mikrobiologija UKC Sarajevo. Za određivanje fenotipova rezistencije na pneumokok su korišteni disk-difuzioni test, kombinovani difuziono-dilucionni test i automatizovani VITEK 2 sistem. problem u invazivnim infekcijama. Najvažniji problem u enterokokoka je pojava rezistencije na vankomicin.

1.UVOD

Autor za korespondenciju:

Lejla Osmanović, MA dipl. ing. MLD

**Klinički centar univerziteta u Sarajevu
O.J. Klinička mikrobiologija**

E-mail: osmanovic_lejla@yahoo.com

Tel: 0038761/218-002



Streptococcus pneumoniae ili pneumococcus je Gram pozitivna bakterija koja pripada rodu *Streptococcus*, familiji *Streptococcaceae*. Jedan je od vodećih uzročnika invazivnih oboljenja kao što su bakterijska pneumonija, septikemija i meningitis. Takođe uzrokuje neinvazivna, ali vrlo česta oboljenja kao što su akutna upala srednjeg uha, sinuzitis i nekomplikovana pneumonija. Invazivne pneumokokne infekcije su povezane sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, naročito u zemljama u razvoju (1). 2000-te godine pneumokokne bolesti su uzrokovale oko 826 000 smrtnih ishoda kod djece uzrasta do 5 godina (2).

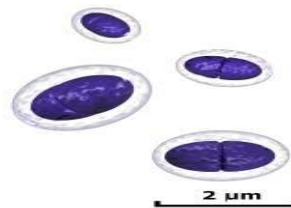


Liječenje pneumokoknih infekcija je otežano zbog porasta i širenja rezistencije na antibiotike. Od posebnog je značaja pojava ukrštene rezistencije pneumokoka na beta laktamske antibiotike i antibiotike iz grupe makrolida. Rezistencija na penicilin uvjetovana je spontanom genskom promjenom bakterijskih proteina koji vežu penicilin (eng. PBP-penicillin binding protein). To su enzimi koji su uključeni u sintezu i modifikaciju stanične stijenke bakterije. Tako PBP u nekih sojeva pneumokoka smanjuju sposobnost stanične stijenke za vezanje s antibioticima. Rezistencija se pojavljuje selekcijom tih sojeva, koji zahtijevaju visoke koncentracije penicilina za zasićenje svojih specifično promijenjenih proteina. Sojevi pneumokoka rezistentni na penicilin mnogo se češće izoliraju iz respiratornog sistema nego iz primarno sterilnih materijala, te stoga možemo zaključiti da su rezistentniji oni sojevi koji se pojavljuju kod kliconoštva, odnosno uzrokuju kolonizaciju ili kontaminaciju (3).

Morfologija

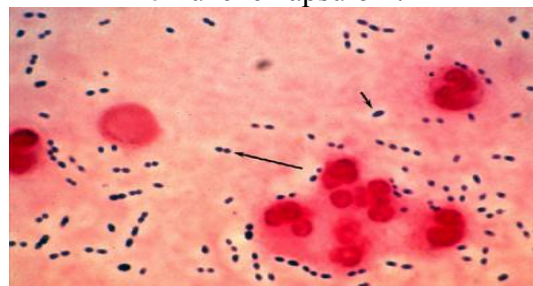
Diplokok je prvi put uočio Pasteur 1880. godine u salivi čovjeka oboljelog od rabijesa, a 1910. godine Neufeld je izvršio tipizaciju na osnovu bubrenja kapsule. *Streptococcus pneumoniae* pripada grupi Gram-pozitivnih bakterija, ali se od njih razlikuje po svom obliku. To je bakterija koja se javlja u paru. Na jednom kraju je zašiljena u vidu plamena svijeće, a drugi kraj je ravan i širok. Mogu biti pojedinačne i u kraćim lancima. Neki sojevi posjeduju i kapsulu koja okružuje jedan par koka ili više parova kada se nalaze u lancima (4). Čelije su dijametra 0,5 do 1,2 μm .

Morfologija kolonija varira, od kolonija obavijenih, velikih (dijametra 1 do 3 mm na krvnom agaru; manjih na čokoladnom agaru), okruglih i mukoidnih, i kolonija nekapsuliranih sojeva manjih i ravnih. Sve kolonije podliježu autolizi vremenom, središnji dio kolonije se rastvara ostavljajući ispupčen izgled (5). Pneumokoki se međusobno razlikuju na osnovi građe polisaharidne kapsule, i upravo se na temelju tih razlika mogu razvrstati u preko 90 različitih serotipova. Polisaharidna kapsula osnova je invazijskog potencijala bakterije, odnosno omogućava joj da lakše izazove infekciju kod čovjeka i izbjegne odbrambenim mehanizmima domaćina, osobito fagocitozu, koja je ključna u odbrani od bakterijskih patogena (3).



Streptococcus pneumoniae

Slika 1. Pneumokok – diplokoke, okružene kapsulom.

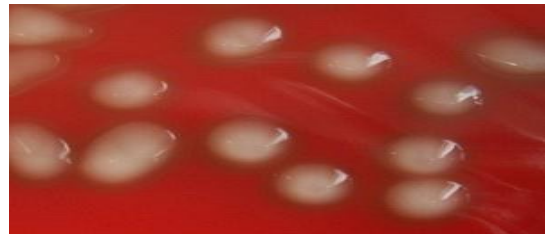
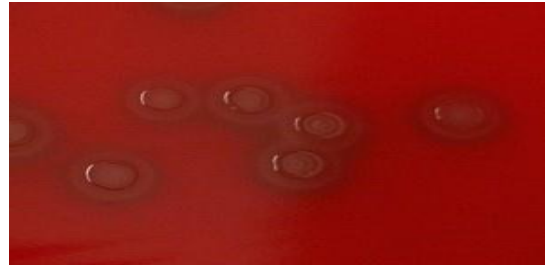


Slika 2. Izgled ćelija *Streptococcus pneumoniae* u direktnom preparatu likvora, obojenom po Gramu; uočavaju se izdužene diplokoke, koje mogu formirati lance



Kulturelne osobine

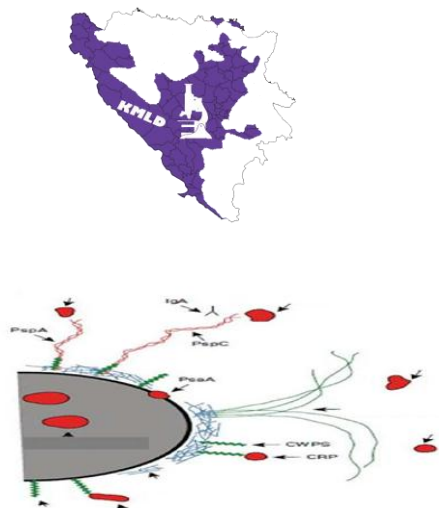
Streptococcus pneumoniae za svoj rast treba povećanu koncentraciju CO₂, od 5 do 10%. Kultiviše se na temperaturi od 35°C (6). Uzročnik ima probirljive nutritivne zahtjeve i raste samo na obogaćenim podlogama sa krvnim produktima (5). Na krvnom agaru raste nakon 24 h u sitnim prozirnim kolonijama sa izraženom zonom α -hemolize. Kolonije mogu biti β -hemolitičke u anaerobnim uvjetima (16). Postoji više faza razvoja pneumokoka i kolonije se razlikuju po izgledu: glatke, sjajne, ravnih ivica (S kolonije), hrapave, mutne, neravnih ivica (R kolonije), i mukoidne, izrazito sluzave pojedinih virulentnih sojeva (tip 3). Kolonije pneumokoka dužim stajanjem mijenjaju svoj izgled: zamute se, deformišu i smanjuju, a kupola im se zaravni. Opisane promjene su posljedica dejstva sopstvenih metaboličkih produkata koje pneumokok stvara (H₂O₂) i nazivaju ih autolizini. Veoma je osjetljiv na promjenu kiselosti sredine tako da je potrebno u određenim intervalima u toku kultiviranja kontrolirati bujonsku kulturu, da bi se dobio obilan rast (6). *Streptococcus pneumoniae* fermentuje karbohidrate, stvarajući mliječnu kiselinu kao primarni metabolički nusprodukt. Raste slabo u medijima sa visokim koncentracijama glukoze, jer mliječna kiselina brzo doseže toksične razine u takvim medijima (5).



Slika 3. Izgled kolonija *Streptococcus pneumoniae* na krvnom agaru *Gore*: tipično udubljenje u kolonijama posle 24 časovne inkubacije, koje se javlja kao posljedica autolize; *Dole*: izgled mukoidnih kolonija *Streptococcus pneumoniae*

Faktori virulencije

Streptococcus pneumoniae posjeduje brojne faktore virulencije koji imaju važnu ulogu u patogenezi infekcije. Prema hemijskom sastavu se faktori virulencije mogu podijeliti u dvije grupe. Prva grupa u osnovi ima šećere i predstavljena je polisaharidnom kapsulom, teihoinskom ili poteihoinskom kiselinom. Druga grupa uključuje brojne površinski vezane proteine i enzime.



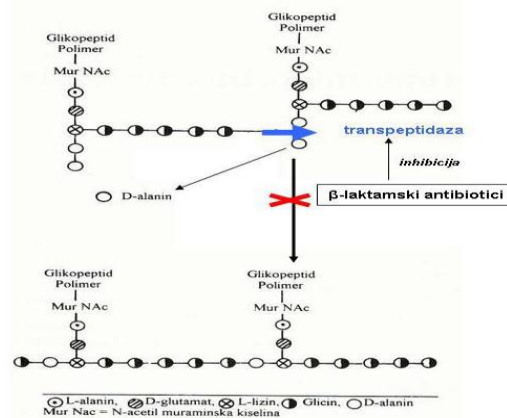
Slika 4. Shematski model ćelijskog zida i površinskih proteina pneumokoka

Na staničnu površinu nadovezuje se jasno razvijena polisaharidna kapsula, koja je ujedno i glavni faktor virulencije (7). Polisaharidna kapsula u potpunosti okružuje bakterijsku ćeliju i predstavlja glavni faktor virulencije pneumokoka (8). Kovalentno je vezana fosfodiastarskim vezama za N-acetilglukozamin peptidoglikana ćelijskog zida. Postoje razlike u sastavu polisaharida kapsule, na osnovu kojih je do danas identifikovano 94 različita serotipa pneumokoka (9, 10). Kapsula većine serotipova je kompleksne građe, sastavljena od multiplih šećera sa razgranatim bočnim lancima. Kod nekih tipova, npr. 3 i 37, kapsula ima relativno jednostavnu strukturu i sadrži samo jedan ili dva šećera, dok je kod drugih sastavljena od brojnih ugljenih hidrata. Uprkos navedenim raznolikostima u građi, kapsula svih tipova ima istu primarnu funkciju, da spriječi opsonofagocitozu i inhibiše aktivaciju komplementa alternativnim putem (11).

Mehanizmi rezistencije pneumokoka na penicilin

Rezistentni sojevi pneumokoka ne proizvode beta-laktamazu. Rezistencija na penicilin uvjetovana je spontanom genskom promjenom bakterijskih proteina koji vežu penicilin (eng. PBP-

penicillin binding protein). To su enzimi koji su uključeni u sintezu i modifikaciju ćelijske stijenke bakterije. Tako PBP u nekih sojeva pneumokoka smanjuju sposobnost ćelijske stijenke za vezanje s antibioticima. Za smanjenu osjetljivost *Streptococcus pneumoniae* na betalaktamske antibiotiske lijekove odgovoran je mehanizam unutarnje rezistencije - izmjene proteina koji vezuju penicilin odnosno ciljnih mjesta djelovanja ovih lijekova.



Slika 5. Inhibicija sinteze peptidoglikana iz ćelijskog zida bakterija pomoću β -laktamskih antibiotika

Rezistencija se pojavljuje selekcijom tih sojeva, koji zahtijevaju visoke koncentracije penicilina za zasićenje svojih specifično promijenjenih proteina. Po ispitivanju velikog broja izolata, uočeno je da varijacija u PBP uzorku predstavlja istinski polimorfizam proteina. I zaista, izolati koji dijele određeni abnormalni, ali jedinstveni uzorak također imaju tendenciju da dijele i ostala svojstva, poput serotipa, otpornosti na druge antibiotike i geografsko porijeklo (12, 13). Na osnovu ovih opažanja predloženo je da otporni izolati pneumokoka predstavljaju



specifičnu, odnosno genetički specifičnu liniju pneumokokalnih klonova (14).

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

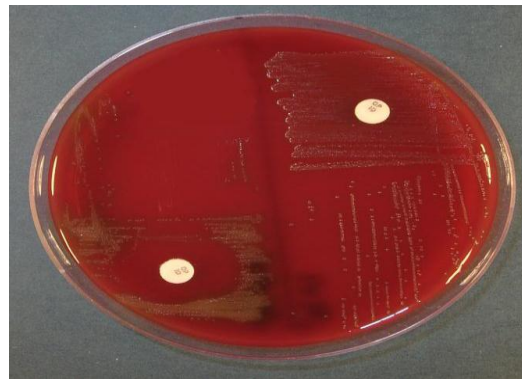
Streptococcus pneumoniae napada različite organe i tkiva. Za pregled se uzima sputum koji je često boje rđe (sadrži eritrocite) oboljelih od krupozne pneumonije. Pored sputuma, u ovisnosti od kliničke slike uzima se likvor, gnoj, punktati, krv, brisevi gornjih respiratornih puteva, srednjeg uha, oka i dr. Bakteriološka dijagnoza postavlja se ustaljenim redoslijedom: ispitivanjem mikroskopskih, kulturelnih, biohemijskih i antigenskih karakteristika. Za njihovu diferencijaciju preporučuje se korištenje sljedećih postupaka:

1. Direktni mikroskopski pregled bolesničkog materijala ima veliki dijagnostički značaj. Bojenje po Gramu uzoraka sputuma je brz način za dijagnostiku pneumokokne pneumonije i meningitisa. U razmazima sputuma, likvora, pleuralne tečnosti, itd. bojenjem po Gramu nalaze se tipične Gram pozitivne bakterije, oblika plamena svijeće, raspoređene u parove, okružene širokom kapsulom. Kod starijih kultura bakterije se mogu odbojiti i pokazati u preparatu kao gram negativne (5). Kapsula se može bolje vidjeti ako se razmaz boji nekim od specijalnih bojenja za kapsulu ili negativnim bojenjem (India ink). Pored bakterija, u razmazu se uvijek nalaze i leukociti.

2. *Streptococcus pneumoniae* za svoj rast treba povećanu koncentraciju CO₂ 5 do 10 %. Kultiviše se na temperaturi

od 35°C. Raste na složenim hranjivim podlogama obogaćenim nativnim bjelančevinama (krv, serum, ascit). *Streptococcus pneumoniae* raste vrlo dobro na krvnom agaru, koji sadrži ovčije eritrocite i mesni ekstrakt, u prisustvu povećane koncentracije CO₂ 5 do 10 %.

3. Optohinski test radi se na principu antibiograma. Izvodi se tako što se na zasijanu kulturu alfa-hemolitičkih streptokoka, za koje se pretpostavlja da bi mogle biti *Streptococcus pneumoniae*, stavi disk optohina i inkubira 24 sata na 37°C. Poslije inkubacije posmatra se rast (4). *Streptococcus pneumoniae* je veoma osjetljiv na male koncentracije optohina, zbog čega se oko diska stvara široka zona inhibicije rasta (30mm) (6).

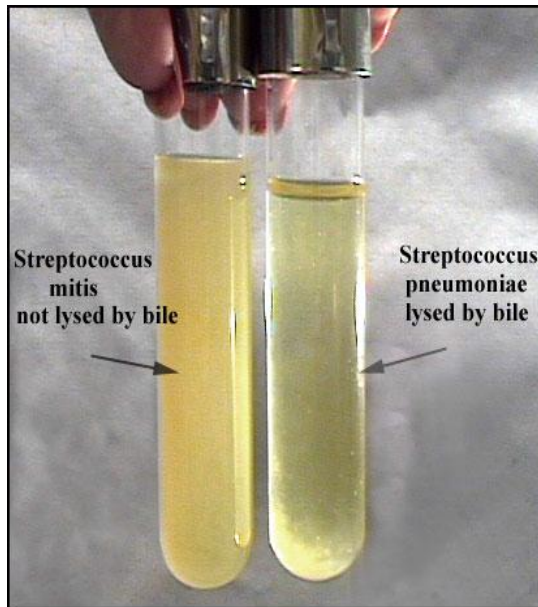


Slika 6. Optohinski test. Lijevo: *Streptococcus pneumoniae*, osjetljiv na optohin; desno: viridans streptokoke – rezistentne na optohin

4. Preporučuje se test topljivosti u žuči i žučnim solima (površinski aktivne supstance). Nakon dodavanja površinski aktivnih supstanci kulturi *Streptococcus pneumoniae*, dolazi do lize kolonija na krvnom agaru i razbistravanju bujonske kulture (6). U roku od dva sata kolonija



pneumokoka lizira, dok alfa hemolitičke streptokoke ostaju neizmijenjene (17).



Slika 7. Test lize žučnim solima u epruveti. *Lijevo:* viridans streptokoke, čija bujonska kultura ostaje zamućena posle dodavanja žučnih soli, test je negativan. *Desno:* *Streptococcus pneumoniae*, čija se bujonska kultura izbistrila posle dodavanja žučnih soli, test je pozitivan

5. *Streptococcus pneumoniae* se može brzo identificirati serološkom tipizacijom. Uzorcima bolesničkog materijala u kojima se nalaze tipični oblici bakterija, dodaje se tipski specifičan antiserum. Test se izvodi na predmetnom staklu i odmah se posmatra pod mikroskopom. Prati se bubrenje kapsule (Neufeldov test). Do bubrenja kapsule dolazi u homolognom serumu, zbog mikroprecipitacije. Na osnovu različitih antigena kapsule podijeljeni su u 83 serološka tipa (6).

6. Biološki ogled izvodi se ubrizgavanjem suspenzije suspektne kulture u fiziološkom rastvoru miša. Ukoliko je ubrizgan pneumokok miš će uginuti od sepse za 24-72 sata. Iz krvi miša će se izolovati pneumokok u čistoj kulturi (17).

Za identifikaciju *S.pneumoniae* se koriste i komercijalni kitovi kao što su Api Rapid Strept, Rapid ID 32 i VITEK (bioMerieux, Marcy l Etoile, France). Serološkim se testovima mogu dokazati protutijela na četiri pneumokokna antigena: C-polisaharid stanične stijenke, kapsularne polisaharide, fosforilkolin i pneumolizin (ključni faktor virulencije) (3).

Serotipizacija izolata može biti korisna iz epidemioloških razloga kako bi se koreliralo širenje specifičnih klonova i slijedilo razvoj otpornosti na antibiotike. Antibiogram treba raditi na izoliranim sojevima (MSD priručnik dijagnostike i terapije).

Zaključno, za pristup bolesniku sa sumnjom na pneumokoknu bolest i dalje se treba ravnati uglavnom prema nekim kliničkim i laboratorijskim podacima, naročito prema broju leukocita, CRP-u i općem stanju djeteta (15).

2.MATERIJAL I METODE

U retrospektivno-prospektivnoj studiji ispitivanje je urađeno na izolatima pneumokoka koji su izolovani iz uzoraka respiratornog trakta pacijenata sa različitih odjela Kliničkog centra univerziteta u Sarajevu koji su zaprimljeni u OJ Klinička mikrobiologija. Studija je obuhvatala period od 01.01.2016 do 01.01.2017.



Podaci o izolatima su uključivali sljedeće podatke: laboratorijski identifikacioni broj, vrstu uzorka, datum uzorkovanja, uzrast i pol pacijenta, dijagnozu.

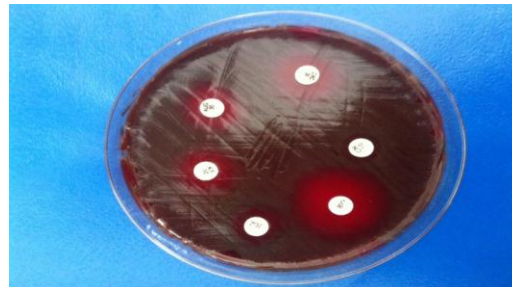
Procedura kod izolacije pneumokoka

Po dospjeću u laboratoriju, uzorak je zasijan na podlogu krvni agar sa razrijeđenjem. Ploče su pohranjene u posudu sa CO₂. Da bi se obezbijedili ti uslovi stavljena je upaljena svijeća ili BD Gas Pak EZ, CO₂ container system. Posuda je stavljena u termostat 16-24 h na 37 °C. Nakon 24 h inkubacije izvršeno je očitavanje porasta sa kulture. Sumnjive kolonije *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) su testirane na krvni sektor sa diskom optohina (6 mm, 5 µg) komercijalno dostupnim. *Streptococcus pneumoniae* je veoma osjetljiv na male koncentracije optohina, zbog čega se oko diska stvara široka zona inhibicije rasta (30 mm). Poslije inkubacije od 16-24 h se očitava zona inhibicije rasta, sa gornje strane otvorene ploče, lenijarom. Ukoliko je prečnik zone ≥ 14 mm, smatra se da je ispitivani izolat osjetljiv na optohin. Za svaki novi lot diskova optohina treba uraditi pozitivnu i negativnu kontrolu.

Ispitivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* na antibiotike

Zbog osjetljivosti pneumokoka na vanjsku sredinu odmah je urađeno testiranje osjetljivosti na antibiotike. Gustina bakterijske suspenzije treba da je 0,5 McFarland ukoliko se, za pravljenje koristi bakterijska kultura sa krvog agara, odnosno 1,0 McFarland, ukoliko je pneumokok kultivisan na čokoladnom agaru. U našem istraživanju korišten je krvni agar za izolaciju pneumokoka, s ciljem zasijavanja

izolovanih i ispitivanih bakterija. Sterilnom ezom pikirane su istovjetne suspektne kolonije ispitivane bakterijske vrste i potom suspendirane u glukozni bujon (McFarland 0.5). Potom se suspenzija ispitivanog soja bakterija iz glukoznog bujona sterilnim štapićem nanijela preko čitave površine hranjive podloge. Prema standardnim shemama aplicirani su na zasijanu podlogu, diskovi filter papira impregnirani antibioticima određene koncentracije. Ispitana je osjetljivost na sljedeće antibiotike: benzilpenicilin, oksacilin, eritromicin, azitromicin, klaritromicin, tetraciklin, hloramfenikol, gentamicin, trimetoprim-sulfametoksazol, cefazolin, ceftriakson, amoksicilin+klavulonska. Petri ploče su inkubirane na 35-37°C unutar 24 h. Bakterije će rasti u okolini diska ovisno o svojoj osjetljivosti na antibiotik. Osjetljivost bakterija je upravno proporcionalna s promjerom zone inhibicije koja se očitava u milimetrima i uspoređuje sa veličinama zone inhibicije dobivenim testiranjem standardnih i poznatih bakterijskih sojeva. Zone osjetljivosti su interpretirane prema CLSI standardima. U našem istraživanju rezultat testa izrazili smo kao R (rezistentan) i S (senzitan). Kao kontrolni soj se koristio *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.



Slika 8. Antibiogram (disk-difuziona metoda) *Streptococcus pneumoniae*



Ispitivanje osjetljivosti na beta-laktamske antibiotike

Za ispitivanje osjetljivosti na beta laktamske antibiotike se upotrebljava disk oksacilina, 1 µg. Ukoliko je zona inhibicije rasta ≥ 20 mm, može se smatrati da je soj osjetljiv na sve beta laktamske antibiotike. Pošto se za liječenje pneumokoknih bolesti najčešće koriste penicilin i cefalosporini treće generacije (npr. ceftriakson), oba standarda (CLSI i EUCAST) upućuju da se odredi vrijednost MIK ovih antibiotika, a svake godine oba standarda daju nove vodiče sa graničnim vrijednostima za interpretaciju kategorija osjetljivosti. Prilikom procjene osjetljivosti soja treba voditi računa da su i CLSI i EUCAST napravili razliku u interpretaciji u zavisnosti da li je soj izazivač meningitisa ili neke druge invazivne ili neinvazivne bolesti.

Granična vrijednost penicilina je prvenstveno dizajnirana kako bi se osigurao uspjeh terapije za pneumokokni meningitis. Međutim, kliničke studije su pokazale da je ishod pneumokokne upale pluća uzrokovan sojevima sa srednjom osjetljivošću na penicilin i koja je tretirana parenteralnim penicilinom se ne razlikuje od pacijenata tretiranih sa drugim agensima. Uzimajući u obzir na mikrobiološke, farmakokinetičke i farmakodinamične podatke, klinička granična vrijednost za benzilpenicilin za ne-meningitis izolate su revidirani i trenutne granične vrijednosti su navedene i u tabeli. U slučaju meningitisa, granične vrijednosti su strožije.

U slučaju da je ispitivani izolat izazivač pneumonije, sepse itd., koriste se drugačiji kriterijumi za interpretaciju, koji zavise i od doze datog lijeka, odnosno koncentracije koju lijek dostiže u krvi.

Tabela 1. Granične vrijednosti za oksacilin

Oksacilin 1µg dijametar zone inhibicije	Antibiotik	Dalje testiranje/interpretacija
≥ 20 mm	svi beta laktami	izvijestiti da je soj osjetljiv, bez obzira na kliničke indikacije
	benzilpenicilin (meningitis) i fenoksimetilpenicilin (sve indikacije)	izvijestiti da je soj rezistentan
< 20 mm	benzilpenicilin (ne-meningitis)	odrediti MIK i interpretirati
	ampicilin, amoksicilin i piperacilin (sa ili bez inhibitora beta laktamaza), cefepim, cefotaksim, ceftriakson	zona ≥ 8 mm: izvijestiti da je soj osjetljiv
		zona < 8 mm: odrediti MIK za beta laktame
	drugi beta laktami	odrediti MIK i interpretirati



Tabela 2. Granične vrijednosti za penicilin

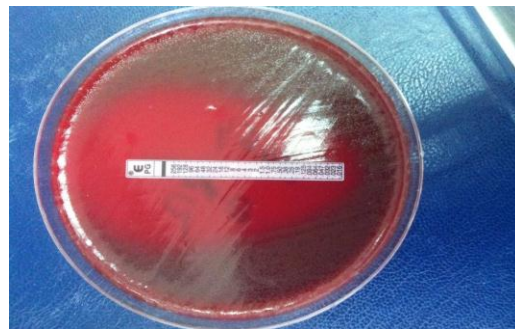
Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (meningealni)	≤0,06	0,12-1	≥2
EUCAST	penicilin (meningealni)	≤0,06	-	>0,06

Tabela 3. Granične vrijednosti za penicilin

Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (ne-meningealni)*	≤2	4	≥8
EUCAST	penicilin (ne-meningealni)**	≤0,06	-	>2

E-test

Vrijednost MIK-a određen je kod izolata *Streptococcus pneumoniae* korištenjem E testa (BioMerieux). Ovaj test predstavlja kombinaciju dilucijske i difuzijske metode. Dizajniran je u vidu tankih, inertnih plastičnih traka čija je jedna strana kalibrirana sa MIK skalom u ug/ml i to od 0,002-1024 ug/ml zavisno od antibiotika. Kada se E test trake apliciraju na površinu agara, antibiotik brzo difundira u agar i stvara određeni gradijent koncentracije. Ispitivani soj pneumokoka je inokuliran na krvni agar kao za disk difuzijski test, zatim su nanesene E-test trake penicilina sa određenim gradijentom koncentracije antibiotika, koje su prenešene sa trake na čvrstu podlogu. Nakon inkubacije od 18 do 24 sata, kada rast bakterija postane vidljiv, uočava se simetrična elipsa inhibicije rasta i očitava se MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) na osnovu veličine zone inhibicije. Rezultat se očitava kao S, I, R i uz to i MIK u ug/ml.



Slika 9. E- test

Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike automatizovanim sistemom Vitek 2

Ispitivanje osjetljivosti na antibiotike je izvedeno automatizovanim VITEK 2 sistemom za brzu izradu testa osjetljivosti (VITEK 2, BioMerieux, Francuska).

Ispitana je osjetljivost na 19 antibiotika (benzilpenicilin, amoksicilin, cefotaksim, ceftriakson, imipenem, levofloksacin, moksifloksacin, ofloksacin, sparfloksacin, eritromicin, telitromicin, pristinamicin, kvinopristin



– dalfopristin, linezolid, vankomicin, tetraciklin, hloramfenikol, rifampicin, trimetoprim–sulfametoksazol) korištenjem kartica AST-P576 prema uputstvu proizvođača (BioMerieux, Francuska). Kao referentni soj u testovima osjetljivosti je korišten *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Rezultati osjetljivosti su tumačeni u skladu sa preporukama CLSI iz 2013. godine. Granične vrijednosti penicilina za MS su: $S \leq 0,06 \mu\text{g/ml}$, $R \geq 2 \mu\text{g/ml}$, a za NMS su: $S \leq 2 \mu\text{g/ml}$, $R \geq 8 \mu\text{g}$.

VITEK 2 Compact vrši adekvatnu identifikaciju do nivoa speciosa za > 300 klinički značajnih bakterija i testiranje osjetljivosti na veliku paletu antibiotika. Aparat omogućava nezavisan rad svakog dijela mikrobiološke laboratorije u smislu odvojene pripreme uzorka, u zavisnosti od potreba svake laboratorije, zahvaljujući tzv. malim pokretnim ćelijama (kasetama) koje se koriste odvojeno od aparata. Aparat automatski osigurava validaciju, a kada su rezultati spremni daje tačan fenotipski profil identificiranog mikroorganizma.

Figure 2-1 illustrates the location of instrument access doors.



Figure 2-1: VITEK® 2 Compact Instrument

Slika 10. VITEK 2 COMPACT aparat

Kaseta je glavna komponenta sistema transporta test kartica. Može da primi do 10 test-kartica sa inokuliranim test-epruvetama.



Figure 2-11: VITEK® 2 Compact Cassette

Slika 11. VITEK 2 COMPACT kasetna

Procedura

Sterilno je prebačeno 3.0 mL sterilne soli (vodeni rastvor 0,45% do 0,50% NaCl,ph 4,5 do 7,0) u providnu plastičnu (polistirensku) test epruvetu (12mmx75mm). Sterilni štapić ili tampon je korišten za prebacivanje dovoljnog broja morfološki sličnih kolonija pneumokoka u epruvetu sa rastvorom soli. Pripremljena je suspenzija homogenog organizma gustine ekvivalentne McFarland-u broj 0,50 do 0,63 koristeći kalibrisani Vitek „ Densichek“. Starost suspenzije ne smije da prelazi 30 minuta prije stavljanja kartica za inokulaciju.

Epruvete sa suspenzijom su postavljene u kasetu. Iz svake epruvete kojom se ispituje biohemijska aktivnost bakterija mikropipetom je prenešena odgovarajuća količina suspenzije u sljedeću epruvetu koja služi za ispitivanje osjetljivosti. Postavljene su odgovarajuće kartice u test epruvete. Pristupljeno je ubacivanju uzoraka u aparat.



Figure 21: View and Maintain Isolate Results

View and Maintain Isolate Results

Patient Name : Jones, Sarah

Lab ID: 103

Organism: Enterococcus faecalis

Review Status: To be reviewed

Bionumber:

ID Confidence:

Analysis Status: 10.25 hr - Final

Analysis Messages:

bioArt Comment:

AST Offline Tests: Beta-Lactamase

View By: Isolate

Filter By: Show All

103-1, Enterococcus faecalis

AST-GP55, Final, Jan 17, 2013, 6904

Antibiotic	MIC	Inte...	Antibiotic	MIC	Inte...	Antibiotic	MIC	Inte...
Beta-Lactamase	NEG	-	Streptomycin High Lev...	SVN-R	R	Clindamycin	(-)	(-)
Benzylicillin	(-)	(-)	Gentamicin			Vancomycin	4	S
Ampicillin	16	R	Ciprofloxacin	(-)	(-)	Tetracycline	(-)	(-)
Ampicillin/Subactam	[s2]	I	Levofloxacin	(-)	(-)	Nitrofurantoin	≤16	S
Oxacillin			Norfloxacin	(-)	(-)	Chloramphenicol	(-)	(-)
Cefazolin			Ofloxacin	(-)	(-)	Rifampicin		
Gentamicin High Level...	SVN-5	S	Erythromycin	(-)	(-)			

Slika 12. Pregled rezultata izolata na VITEK2 Compact sistemu



3. REZULTATI

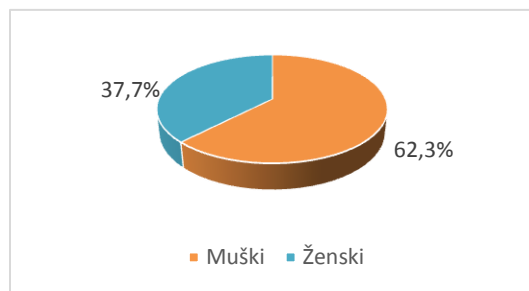
U periodu od 01.01.2016 do 01.01.2017 ukupno su ispitana 53 pacijenta. Izolati *Streptococcus pneumoniae* su dokazani iz uzoraka respiratornog trakta sa različitih odjela Kliničkog centra univerziteta u Sarajevu.

Pregled spola ispitanika

U tabeli 1. prikazana je zastupljenost muškog i ženskog spola ispitanika. Analizom zastupljenosti dokazano je da su muškarci bili više zastupljeni sa 33 ili 62,3% u odnosu na žene koje su bile zastupljene sa 20 ili 37,7% slučajeva. Analiza putem hi-kvadrat testa za jedan uzorak pokazuje da ne postoji signifikantna razlika u spolnoj distribuciji ($\chi^2=3,189$; $p=0,074$).

Tabela 3. Prikaz spolne zastupljenosti ispitanika prema rezultatu analize

Spol			
	N	%	
Muški	33	62,3	
Ženski	20	37,7	
Ukupno	53	100,0	



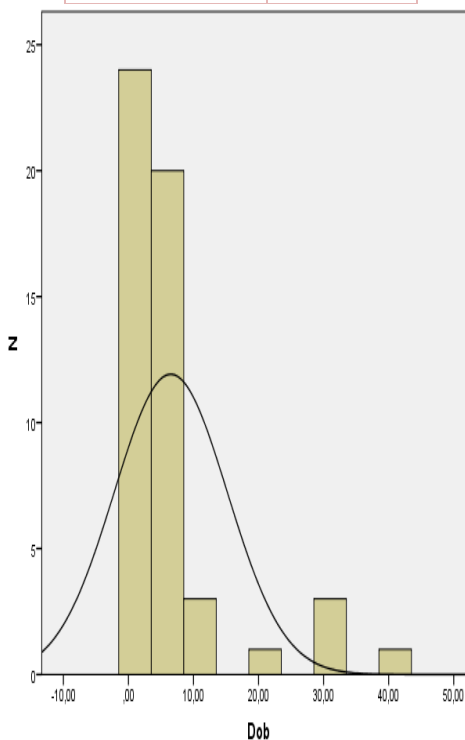
Grafikon 1. Grafički prikaz spolne zastupljenosti ispitanika

Starosna dob ispitanika

Analizom starosne strukture dokazano je da je prosječna starosna dob ispitanika iznosila $6,5 \pm 8,7$. Najmlađi ispitanik je imao 1 godinu, a najstariji 42. Analiza putem Studentovog t testa pokazuje da postoji signifikantno odstupanje od očekivane distribucije ($t=5,387$; $p=0,0001$) u smislu veće zastupljenosti ispitanika mlađe životne dobi (ispod 10 godina života).

Tabela 4. Prosječna starost ispitanika prema rezultatu analize

Prosjek	6,5000
Std. greška	1,20660
Std. devijacija	8,70091
Minimum	1,00
Maksimum	42,00



Grafikon 2. Grafički prikaz prosječne starosti ispitanika

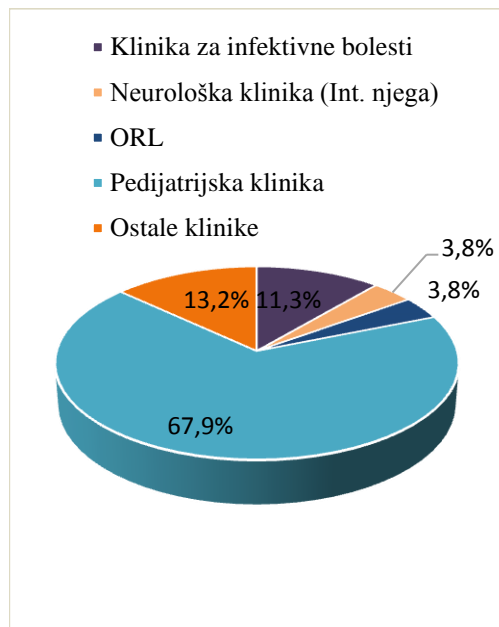


Prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

Analizom distribucije izolata u odnosu na klinike dokazano je da najveći broj izolata potiče sa Pedijatrijske klinike 36 (67,9%), nakon koje slijede Klinika za infektivne bolesti sa 6 (11,3%), te ORL i Neurološka klinika sa 2 (3,8%). Izolati sa ostalih klinika i ustanova su bili zastupljeni sporadično (tabela 3).

Tabela 5. Prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

Klinika		
	N	%
Ambulanta	1	1,9
C-3	1	1,9
C-8	1	1,9
D.Z. Olovo	1	1,9
Klinika za hematologiju	1	1,9
Klinika za infektivne bolesti	6	11,3
Neurološka klinika (Int. njega)	2	3,8
ORL	2	3,8
Pedijatrijska klinika	36	67,9
Klinika za plućne bolesti	1	1,9
Psijhijatrijska klinika	1	1,9
Ukupno	53	100,0



Grafikon 3. Grafički prikaz zastupljenosti izolata po klinikama

REZULTATI ISPITIVANJA OSJETLJIVOSTI/ REZISTENCIJE IZOLATA NA ANTIBIOTIKE

U datom periodu ukupno su ispitana 53 izolata. Svi izolati su testirani na sljedeće antibiotike: benzilpenicilin, oksacilin, eritromicin, azitromicin, klaritromicin, tetraciklin, hloramfenikol, gentamicin, trimetoprim sulfametoksazol, cefazolin, ceftriakson, amoksisicilin+klavulonska kiselina.

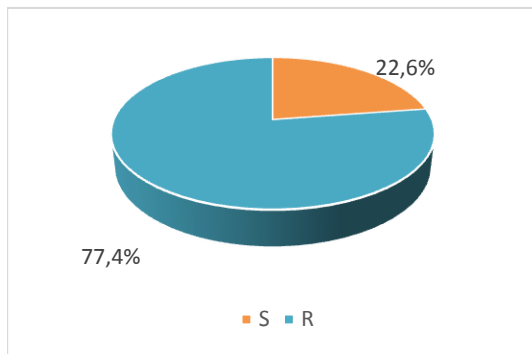
Prikaz osjetljivosti/ rezistencije na penicilin

Od ukupnog broja izolata (N=53), analiza je pokazala da je 12 (22,6%) izolata bilo osjetljivo na penicilin, dok je rezistencija zabilježena kod 41 (77,4%) izolata.



Tabela 6. Tabela prikaz rezistencije/osjetljivosti izolata na penicilin

	N	%
S	12	22,6
R	41	77,4
Ukupno	53	100,0



Grafikon 4. Prikaz osjetljivosti/rezistencije izolata u odnosu na rezultat analize

Prikaz osjetljivosti/rezistencije na ostale antibiotike

Komparacija osjetljivosti/rezistencije svih antibiotika u odnosu na penicilin (S – 12; 22,6% R – 41;77,4%) pokazuje slijedeće:

Oksacilin pokazuje isti omjer S i R kao i penicilin, bez signifikantne razlike ($p>0,05$).

Eritromicin, azitromicin i klaritromicin pokazuju bolji omjer S:R u odnosu na penicilin (26:27), uz signifikantnu razliku ($p<0,05$).

Tetraciklin pokazuje statistički značajno veću senzitivnost (34:19) u odnosu na penicilin ($p<0,05$).

Gentamicin pokazuje signifikantno manju senzitivnosti (2:51) u odnosu na penicilin ($p<0,05$).

Trimetoprim sulfametoksazol pokazuje veću senzitivnost (17:35) u odnosu na penicilin, bez statističke signifikantnosti ($p>0,05$).

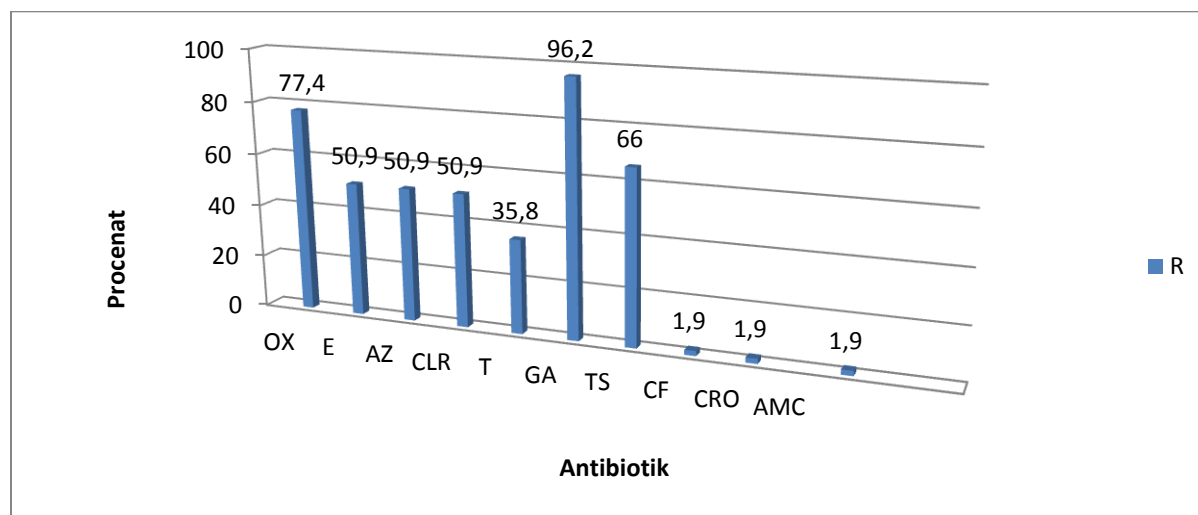
Cefazolin i ceftriakson pokazuju isti omjer S:R (52:1) u odnosu na penicilin, uz signifikantnu razliku ($p<0,05$).

I amoksisicilin+klavulonska kiselina pokazuje bolju senzitivnost (51:2) u odnosu na penicilin, uz signifikantnu razliku ($p<0,05$).



Tabela 7. Tabelarni prikaz osjetljivosti/ rezistencije izolata na ostale antibiotike

NAZIV ANTIBIOTIKA		N	%	Komparacija u odnosu na P
OXACILIN	S	12	22,6	$\chi^2=0$ p=1
	R	41	77,4	
ERITROMICIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
AZITROMYCIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
CLARITROMYCIN	S	26	49,1	$\chi^2=8,04$ p=0,005
	R	27	50,9	
TETRACYCLINE	S	34	64,2	$\chi^2=8,588$ p=0,0001
	R	19	35,8	
	N/A	1	1,9	
HLORAMFENIKOL	S	53	100,0	$\chi^2=16,862$ p=0,0001
	R	0	0,0	
GENTAMYCIN	S	2	3,8	$\chi^2=8,23$ p=0,004
	R	51	96,2	
TRIMETOPRIMSULFAMETOKSAZOL	S	17	32,1	$\chi^2=1,326$ p=0,249
	R	35	66,0	
	N/A	1	1,9	
CEFAZOLIN	S	52	98,1	$\chi^2=13,095$ p=0,0001
	N/A	1	1,9	
CEFTRIAZONE	S	52	98,1	$\chi^2=13,095$ p=0,0001
	N/A	1	1,9	
AMOXICILIN/CLAVULANIC ACID	S	51	96,2	$\chi^2=12,234$ p=0,0001
	R	1	1,9	
	N/A	1	1,9	



Grafikon 5. Prikaz osjetljivosti/rezistencije svih antibiotika

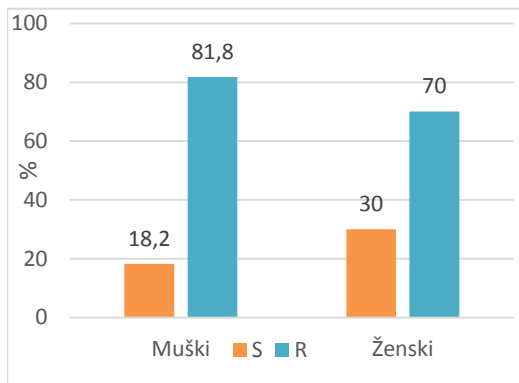


Prikaz osjetljivosti/rezistencije na penicilin prema spolu

Komparacija spolne distribucije prikazana je u tabeli 6. Analiza senzitivnosti/rezistencije pneumokoka na penicilin u odnosu na spol pokazuje da je rezistencija zabilježena nešto češće kod muškaraca (81,8%) u odnosu na žene (70%), ali bez statistički signifikantne razlike ($p>0,05$), što ukazuje da spol nema značajnog uticaja na senzitivnost/rezistenciju.

Tabela 8. Tabelarni prikaz rezistencije pneumokoka na penicilin prema spolu

		Spol		Ukupno
		Muški	Ženski	
S	N	6	6	12
	%	18,2	30,0	22,6
R	N	27	14	41
	%	81,8	70,0	77,4
Ukupno	N	33	20	53
	%	100,0	100,0	100,0



Grafikon 6. Prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka prema spolu

Prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka na penicilin prema dobi

Komparacija prema dobi pokazuje da je senzitivnost pneumokoka zabilježena u mlađoj prosječnoj životnoj dobi ispitanika od $4,64 \pm 3,04$ godina u odnosu na rezistentne izolate koji su poticali od ispitanika u prosječnoj dobi od $7 \pm 9,64$ godina.

Zbog neravnomjerne distribucije analiza je provedena neparametrijskom metodama putem medijane i interkvartilnog raspona uz korištenje Maan-Whutney testa.

Na osnovu rezultata MW testa možemo zaključiti da se dob ne razlikuje statistički signifikantno ($p>0,05$) te da dob nema značajnog uticaja na senzitivnost/rezistenciju.

Tabela 9. Tabelarni prikaz osjetljivosti/rezistencije pneumokoka na penicilin prema dobi ispitanika

	Dob				
	Prosjeck	Std. greška	Mediana	25 percentil	95 percentil
S	4,64	3,04	4,00	2,00	10,00
R	7,00	9,64	4,00	2,00	31,00

$Z=-0,079$; $p=0,937$

Komparacija rezultata disk difuzione metode i E testa

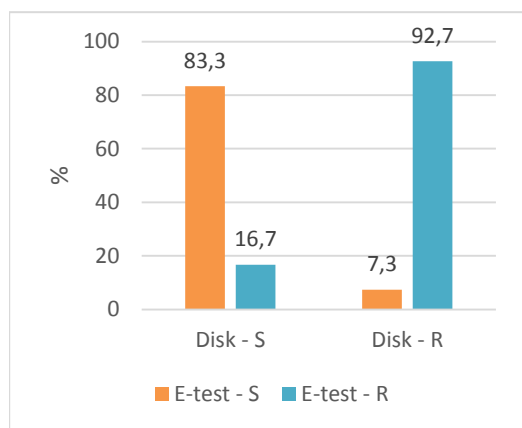
Komparacija metoda ispitivanja prikazana je u tabeli 8. Od ukupno 12 senzitivnih izolata pneumokoka dokazanih disk difuzionom metodom, E test je potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat dokazan disk difuzionom metodom, E test potvrdio rezultat u 38 (92,7%) slučaja. Analiza testa korelacije pokazuje da je ista statistički signifikantna ($\rho=0,739$; $p<0,05$), te da se rezultati



Tabela 10. Tabelarni prikaz komparacije rezultata dvije metode

		Disk difuziona metoda		Ukupno	
		S	R		
E test - P	S	N	10	3	13
		%	83,3	7,3	24,5
	R	N	2	38	40
		%	16,7	92,7	75,5
Ukupno		N	12	41	53
		%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=28,977$; $p=0,0001$
 $\rho=0,739$; $p=0,0001$



Grafikon 7. Grafički prikaz komparacije disk difuzione metode i E testa

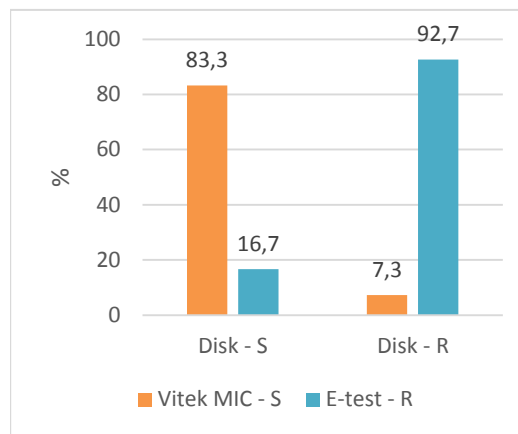
Komparacija rezultata disk difuzione i automatske metode

Komparacija disk difuzione i automatske metode je dala iste rezultate kao i komparacija disk difuzione metode i E testa (tabela 9). Analiza testa korelacije pokazuje da je ista statistički signifikatna ($\rho=0,739$; $p<0,05$), te da se rezultati dvije metode podudaraju u 73,9% slučajeva. Od ukupno 12 senzitivnih izolata pneumokoka dokazanih disk difuzionom metodom, Vitek je potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat dokazan disk difuzionom metodom, Vitek potvrdio rezultat u 38 (92,7%) slučajeva.

Tabela 11. Prikaz komparacije rezultata disk difuzione i automatske metode

		Disk difuziona metoda		Ukupno	
		S	R		
Vitek MIC za P	S	N	10	3	13
		%	83,3	7,3	24,5
	R	N	2	38	40
		%	16,7	92,7	75,5
Ukupno		N	12	41	53
		%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=28,977$; $p=0,0001$
 $\rho=0,739$; $p=0,0001$



Grafikon 8. Grafički prikaz komparacije rezultata disk difuzione i automatske metode

Komparacije rezultata E testa i automatske metode

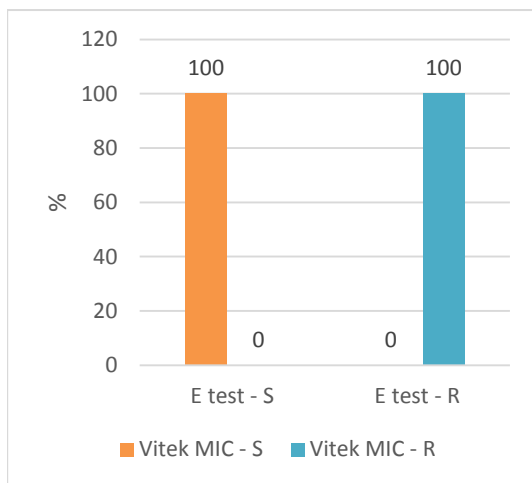
Komparacijom metoda E testa i automatske metode, rezultati ispitivanja su pokazali da je dokazan isti procenat rezistencije/osjetljivosti pneumokoka putem E testa i određivanja MIC putem automatske metode Vitek (tabela10). Rezultat analize korelacije pokazuje da je ista statistički signifikatna ($\rho=1$; $p<0,05$), te da se rezultati dvije metode podudaraju u 100 % slučajeva.



Tabela 12. Tabelarni prikaz komparacije rezultata E testa i automatske metode

		E test		Ukupno
		S	R	
Vitek MIC za P	S	N 13	0	13
		% 100,0	0,0	24,5
	R	N 0	40	40
		% 0,0	100,0	75,5
Ukupno	N	13	40	53
	%	100,0	100,0	100,0

$\chi^2=53,000$; $p=0,0001$
 $\rho=1$; $p=0,0001$



Grafikon 9. Grafički prikaz komparacije rezultata E testa i automatske metode

4. DISKUSIJA

Prošlo je više od 70 godina od početka masovne primjene antibiotika, pa se razvoj rezistencije može smatrati očekivanim procesom evolucije, odnosno razvojem genetskih modifikacija, tj. adaptacije bakterija na novonastalu situaciju u okruženju. S obzirom na kratko vrijeme od samo 20 minuta za koje se broj mnogih bakterija duplira, postaje jasno koliko su velike mogućnosti za razvoj rezistencije. Problem rastuće rezistencije bakterija na propisane antibiotike posebno je izražen u ambulantnim i hospitalnim uslovima (18).

Povećanje antibiotske rezistencije je upravo srazmjerno porastu upotrebe antibiotika u liječenju infekcija (19). Naime, najveći broj rezistentnih bakterija je vezan za bolničke infekcije, vjerovatno zato što antibiotici spadaju u najčešće propisivane i korištene lijekove kod hospitalizovanih bolesnika. Tako se procenjuje da oko 30-50% hospitalizovanih bolesnika primaju antibiotike, a da 50% njih nije adekvatno propisano (20). Poseban problem predstavlja njihova neracionalna, profilaktička upotreba kao i farmakoterapijski neopravdane kombinacije dva ili više antibiotika istovremeno koje mogu dovesti do razvoja rezistencije (21).

Međutim, iako se antibiotici koriste još od 1940. godine multicentrične, prospektivne, kliničke studije počinju da se sprovode tek u ranim devedesetim godinama prošlog vijeka. Jedna od najranijih studija praćenja bila je *Aleksandar studija*, koja je započeta 1992. godine i bila fokusirana isključivo na respiratorne infekcije (22). Od tada pa do danas, sprovode se brojne kliničke studije praćenja potrošnje antibiotika sa posebnim osvrtom na antibiotsku rezistenciju: SMART, EARS-net, PROTEKT, SENTRY i TEST studija, koje se često citiraju u stručnim i naučnim krugovima (23).

Istraživanje o fenotipskim metodama i njihovom značaju u detekciji penicilin rezistentnog *Streptococcus pneumoniae* je provedeno u periodu 01.01.2016-01.01.2017 u KCUS. Ispitana su 53 izolata pneumokoka sa ciljem dokazivanja osjetljivosti/rezistencije na penicilin.



Analiza spolne distribucije ispitanika je pokazala da su muškarci bili više zastupljeni sa 33 (62,3%), a žene sa 20 (37,7%), ali nije dokazana statistički značajna razlika.

Prema rezultatima slične studije tokom 2012.-2013. godine kojom su obuhvaćeni svi bolesnici do 18 godina starosti kojima je izoliran pneumokok iz primarno sterilnih materijala, od 67 ispitanika, ženskog spola je bilo 35 (52,24%), dok je 32 (47,76%) bilo muškog spola (24).

Ispitivanjem učestalosti izolata pneumokoka rezistentnih na penicilin u našem istraživanju utvrđeno je da 22,6 % (12) izolata bilo osjetljivo na penicilin, dok je kod 77,4 % (41) izolata utvrđena rezistencija.

Prema sličnoj studiji Jovanović i saradnici koja je obuhvatala period 2014. do 2015. godine, rezultati su pokazali da od 61 ispitanog soja *Streptococcus pneumoniae* na penicilin je bilo osjetljivo 21 (34,4%). Njihova vrijednost je bila manja od 0,06 µg/ml. Smanjenu osjetljivost na penicilin pokazalo je 40 (65,6%) sojeva (16).

Devedesetih godina otpornost pneumokoka na penicilin je na globalnom nivou dostigla 37%, od čega je 23% sojeva bilo potpuno rezistentno (25). Aleksandar projekat je pokazao porast rezistencije na penicilin u mnogim dijelovima svijeta. U SAD u desetogodišnjem periodu (1992.-2001.godine) rezistencija je porasla sa 5,6% na 20,4%, u Španiji sa 24,9% na 31,2% i u Francuskoj sa 7,7% na 35,8% (26). Nakon uvođenja konjugovane pneumokokne vakcine početkom 2000. godine, dolazi do postepenog smanjenja zastupljenosti rezistencije na penicilin. Prema podacima PROTEKT US studije

koja je obuhvatila 39 495 izolata pneumokoka od pacijenata sa vanbolničkom pneumonijom u SAD u periodu od 2001.-2004. godine, dolazi do postepenog pada rezistencije pneumokoka na penicilin sa 26,3% na 16,5%. Sa druge strane, zapažen je porast prevalencije multirezistentnih sojeva (27).

Prema podacima španske referentne laboratorije, u periodu od 1999.-2008. godine zastupljenost PNSP progresivno opada sa 33,9% na 22,3%. Pad zastupljenosti PNSP je naročito zabilježen u periodu 2005.-2008. godine, što je povezano sa uvođenjem PCV7 vakcine za djecu (28).

Podaci ABCs programa (*engl.* The Active Bacterial Core Surveillance) ukazuju da je u SAD 2007. godine neosjetljivost *S.pneumoniae* na penicilin iznosila 25,6%, da bi 2008. godine pala na 24,8% a već 2010. godine na 10,6% (29).

Na izvještavanje o osjetljivosti pneumokoka na penicilin su uticale promjene u graničnim vrijednostima. Prema starim graničnim vrijednostima, soj pneumokoka se smatrao osjetljivim ukoliko mu je vrijednost MIK penicilina iznosila $\leq 0,06$ µg/ml, bez obzira na vrstu materijala iz kojeg je soj izolovan i način davanja lijeka. Uprkos porastu rezistencije pneumokoka na penicilin u mnogim djelovima svijeta, zapažen je nedostatak korelacije između rezistencije *in vitro* sa kliničkim odgovorom kod nemeningealnih pneumokoknih infekcija (30). U Evropi je, u periodu od 2008.-2011. godine primjećen trend značajnog opadanja rezistencije na penicilin kod pneumokoka u Belgiji, Francuskoj i Španiji, u kojima je registrovano <1%, 27%, odnosno 22% PNSP. Sa druge



strane trend signifikantnog porasta neosjetljivosti *S. pneumoniae* na penicilin je zabilježen u Bugarskoj (37%), Irskoj (20%) i Luksemburgu (19%) (31). U južnoevropskim zemljama je zabilježen viši nivo rezistencije nego u zapadnoevropskim zemljama. U južnim i istočnim zemljama Mediterana zastupljenost PNSP je i dalje bila visoka. U prosjeku je 26% invazivnih izolata pneumokoka bilo neosjetljivo na penicilin, sa najvišom rezistencijom u Alžiru 44% i Libanu 40% (32).

Krajem 2012. godine je, u nekoliko evropskih zemalja, vodič za ispitivanje antimikrobne rezistencije prema CLSI zamijenjen vodičem koji preporučuje EUCAST. Prema kriterijumima EUCAST definisane su strožije granične vrijednosti osjetljivosti pneumokoka na penicilin. Korištenje kriterijuma EUCAST se odrazilo na izvještavanje o porastu rezistencije pneumokoka na penicilin i cefotaksim, a samim tim i na korištenje povećanih doza antibiotika i na povećanu upotrebu lijekova druge i treće linije u liječenju infekcija respiratornog trakta. Naime, oba korištena standarda (CLSI i EUCAST) baziraju svoje granične vrijednosti u odnosu na dozu lijeka i vrijeme davanja lijeka (33).

Prema podacima EARS-Neta iz 2012. godine, zastupljenost invazivnog PNSP u Evropi iznosi 11,6%. Najviše vrijednosti su zabilježene na Malti (38,9%), u Rumuniji (37,2%) i Bugarskoj (28,6%), a najniže u Estoniji (0%), Belgiji (1,5%) i Holandiji (1,5%). Trend porasta rezistencije pneumokoka na penicilin je tokom 2009-2012. godine zabilježen u Belgiji, Danskoj, Finskoj, Norveškoj i Velikoj Britaniji, dok je značajan pad rezistencije zabilježen u Francuskoj,

Luksemburgu i Portugalu (34).

Kada analiziramo podatke o rezistenciji pneumokoka na penicilin iz zemalja u okruženju, uočavamo da je incidencija rezistencije invazivnih izolata pneumokoka u 2015. godini u Sloveniji iznosila 16,8% i u Hrvatskoj 31% u 2013. godini (35). Studija o osjetljivosti pneumokoka u Bugarskoj iz 2014. godine prikazala je 28,1% rezistentnih izolata (36). U zemljama Mediterana, gdje su stope rezistencije pneumokoka na antibiotike bile tradicionalno visoke, bilježi se pad nakon uvođenja obavezne pneumokokne vakcine. Prema podacima iz 2013. godine, one sada iznose 27,6% u Španiji, 22,4% u Francuskoj, a 14,6% u Italiji. Standardno niske stope su registrovane u zemljama Skandinavije: Norveškoj (3,3%), Švedskoj (6,8%) i nešto veće u Finskoj (14,1%) (37).

Rezistencija na penicilin je često povezana sa rezistencijom na druge klase antibiotika tzv. korezistencija. Istovremena rezistencija pneumokoka na makrolide i penicilin se posljednjih godina sve više širi.

U našem istraživanju, od ukupnog broja izolata (N=53), njih 26 (49,1%) je bilo osjetljivo na eritromicin, dok je rezistencija zabilježena kod 27 (50,9%) izolata.

Prema istraživanju sprovedenom u Srbiji u periodu od 2014. do 2015. koje je obuhvatilo 61 soj *Streptococcus pneumoniae* izolovan iz sadržaja srednjeg uha pacijenata mlađih od 5 godina, rezultati su pokazali da je rezistencija na eritromicin zabilježena kod čak 40 (65,6%) izolata, dok je 21 (34,4%) soj bio osjetljiv (16).

Prevalencija takvih sojeva značajno varira među državama (22).



U periodu od 2003.-2005. godine u zemljama Mediterana je zapažena visoka prevalencija kombinovane rezistencije na ova dva antibiotika, sa najvišim vrijednostima u Tunisu 24%, dok je u Egiptu iznosila svega 3% (20). U Španiji je nivo udružene rezistencije među pedijatrijskim izolatima varirao između 24% i 35% u periodu od 1997.-2003. godine. Nakon toga dolazi do značajnog i progresivnog pada udružene rezistencije na 11,5% u 2008. godini (38).

U našem istraživanju je dokazana visoka rezistencija na makrolide. Rezultati su pokazali da je od ukupnog broja izolata (N=53), rezistencija zabilježena kod 27 (50,9%) izolata.

Prema poslednjim podacima EARS-Neta-a iz 2012. godine zastupljenost udružene rezistencije na penicilin i makrolide u Evropi iznosi 8,7%. Kreće od 0% u Estoniji i Litvaniji do preko 30% na Malti (38,9%) i u Rumuniji (32,5%). Tokom 2009.-2012. godine je trend značajnog porasta MRPNP sojeva zabilježen u Danskoj, Litvaniji, Norveskoj, Španiji, Švedskoj i Velikoj Britaniji. Međutim, u zemljama poput Francuske i Portugala uočen je pad (34).

U našem istraživanju rezistencija na hloramfenikol nije zabilježena. Od ukupno izolovanih 53 izolata pneumokoka, svi su bili osjetljivi na ovaj antibiotik.

Hloramfenikol se decenijama koristio u empirijskoj terapiji akutnog bakterijskog meningitisa. Rezistencija na hloramfenikol je češća među PNSP sojevima i 2003. godine u Španiji je iznosila 21% (39). U periodu od 2008.-2012. godine rezistencija invazivnih sojeva pneumokoka na Tajvanu je iznosila 26,2% (40), a u nekim zemljama

je dostigla čak 40% (41). Sa druge strane, u Brazilu je, tokom 2010. godine rezistencija pneumokoka na hloramfenikol iznosila svega 3,3% (42). U Grčkoj je rezistencija pneumokoka na hloramfenikol takođe niska ali je zapažen porast rezistencije sa 0,7% (2009. godine) na 3,2% (2012. godine) (43). Porast rezistencije na hloramfenikol bi mogao da se očekuje i u drugim zemljama u kojima se hloramfenikol intenzivno koristi i gde se ne sprovodi vakcinacija protiv pneumokoka.

U odnosu na metodologiju ispitivanja korištenu u našoj studiji, disk-difuzioni metod, prvi put opisan 1966. godine je dobro standardizirana i širom svijeta primijenjena metoda. Uz manje modifikacije prihvaćena je kao referentna metoda za rutinsku primjenu u laboratorijama. Iako je difuziona metoda prihvaćena kao standard u mikrobiološkim laboratorijama, postoje slučajevi kada su rezultati ove metode nedovoljni. U teškim, prolongiranim infekcijama (npr. endokarditis) potrebno je kvantitativnom metodom odrediti preciznu dozu antibiotika (44).

U toku našeg istraživanja komparacijom metoda ispitivanja zabilježeno je da je od ukupno 12 izolata osjetljivih na penicilin dokazanih disk- difuzionom metodom, E test potvrdio rezultat u 10 (83,3%), dok je u odnosu na 41 rezistentan izolat potvrdio isti u 38 (92,7%) izolata. Analiza testa korelacije pokazuje da se rezultati dvije metode podudaraju u 73,9% slučajeva. Dodatna analiza ove dvije metode je pokazala senzitivnost 83,3%, specifičnost 92,7%, PPV(S) 76,9% te NPV(R) 95%. Komparacijom E testa i automatske metode, dokazan je isti procenat



rezistencije/osjetljivosti izolata sa obje primjenjene metode. Za ispitivanje osjetljivosti pneumokoka na penicilin upotrebljava se disk oksacilina kao skrining metod. Prema smjernicama EUCAST ukoliko je zona inhibicije rasta oksacilina manja od 20 mm, upućuje se na određivanje vrijednost MIC-a. Naša studija je pokazala testom korelacije da je metod izbora za određivanje MIC-a penicilina neka od primjenjenih metoda ispitivanja i to E test i/ili automatska metoda ispitivanja. Prema rezultatima koji se dobiju određivanjem MIC-a vrši se interpretacija osjetljivosti na penicilin (S, R). Disk-difuziona metoda ostaje metoda izbora za visoko osjetljive izolate pneumokoka i koristi se kao rutinska u većini laboratorija.

Iako nema komercijalnih testova, razvijeno je više protokola za reakcije PCR pomoću kojih je moguće identifikovati gene specifične za *S. pneumoniae*. Detektuju se *lytA*gen (za autolizin), *ply*gen (za pneumolizin), *psaA*gen (za pneumokokni površni adhezin). Od gore pomenutih gena, *lytA*gen se smatra najspecifičnijim za pneumokok, s obzirom da se ostala dva relativno često nalaze i kod ostalih streptokoka iz grupe *mitis*. Za identifikaciju pneumokoka je, takođe, vrlo specifičan PCR za detekciju 16S Rrna (45). Molekularne metode također, omogućuju praćenje gena rezistencije kod pneumokoka. Novi RT PCR testovi mogu detektovati gene rezistencije direktno iz kliničkih uzoraka u par sati.

Praćenje otpornosti pneumokoka na antibiotike je prijeko potrebna polazišna tačka za sve intervencije usmjerene prema kontroli razvoja i širenja otpornosti. Podaci o otpornosti u vlastitoj sredini moraju biti osnova za

osmišljavanje empirijske terapije, kako bi bila što uspješnija u liječenju svakoga pojedinačnoga bolesnika, te ujedno učinkovita u sprječavanju širenja otpornih sojeva u zajednici. Uspjeh pojedinih intervencija usmjerenih prema smanjenju otpornosti na antibiotike, može se mjeriti jedino ako postoje podaci o razini otpornosti prije intervencije i poslije nje.

U borbi protiv širenja rezistencije pneumokoka na antibiotike ključnu ulogu imaju i znanstvena istraživanja kojima se otkrivaju novi mehanizmi rezistencije i mogućnosti njihove prevencije i kontrole.

6. LITERATURA

1. O'Brien KL, Santosham M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. *Am J Epidemiol.* 2004; 159:634–644.
2. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009; 374(9693):893–902.
3. Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Shoenwald S. *Infektologija*. Zagreb. 2006. Profil International.
4. Bešlić E, saradnici. *Medicinska mikrobiologija*. Sarajevo 2010; 208-209.
5. Murray PR, *Streptococcus and enterococcus*. In: Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. *Medical microbiology*. 8 th edition. Philadelphia: Elsevier, 2016; 195-199.
6. Hukić M, Gram-pozitivne koke. U: Hukić, M, saradnici. *Bakteriologija*. Sarajevo: Jež, 2005; 170-171.



7. Kalenić S, Streptokoki. U: Kalenić S, saradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; 134-138.
8. Hardy GG, Magee AD, Ventura CL, Caimano MJ, Yother J. Essential role for cellular phosphoglucosyltransferase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2001; 69:2309–2317.
9. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftaden S, Zhou F, Liu C, et al. First report of putative *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. *J Infect Dis*. 2009; 200:1375–1380.
10. Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis*. 2010; 202(1):29–38.
11. Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not *PspA* type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2003; 71:218–225.
12. Markiewicz Z, Tomasz A. Variation in penicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. *J Clin Microbiol* 1989; 27:405-410.
13. Jabes D, Nachman S, Tomasz A. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* 1989; 159:16-25.
14. Munoz R, Musser JM, Crain M, Briles DE, Marton A, Parkinson AJ, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* 1992; 15:112-8.
15. Markovinović L. Klinička slika invazivne pneumokokne bolesti u djece. *Pediatr Croat*. 2011; 55(Supl 1):81-90.
16. Jovanović L, Isailović K, Opavski N. Frequency of resistance to penicillin and erythromycin of pneumococcal strains that caused otitis media. *MedPodml* 2017; 68(1):26-30.
17. Karakašević B, saradnici. *Mikrobiologija i parazitologija*. Medicinska knjiga. Beograd-Zagreb. 1987; 626-630.
18. Vlahović-Palcevski V, Morović M, Palcevski G, Betica-Radić L. Antimicrobial utilization and bacterial resistance at three different hospitals. *Eur J Epidemiol* 2001; 17(4):375–383.
19. Raymond DP, Pelletier SJ, Sawyer RG. Antibiotic utilization strategies to limit antimicrobial resistance. *Semin Respir Crit Care Med* 2002; 23(5):497–501.
20. Willemsen I, Groenhuijzen A, Bogaers D, Stuurman A, van Keulen P, Kluytmans J. Appropriateness of antimicrobial therapy measured by repeated prevalence surveys. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(3):864–867.
21. Goosens H. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(3):12-5.
22. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:ii3-ii21.
23. Hawser S. Surveillance programmes and antibiotic resistance: Worldwide and regional monitoring of antibiotic resistance trends. *Antibiotic Resist* 2012; 211:31-43.
24. Martinović I. Mogućnost prevencije invazivne pneumokokne bolesti kod djece u Hrvatskoj. *Pediatr Croat* 2015; 49 (Supl 1): 198-201.



25. Felmingham D, Canton R and Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004. *J Infect.* 2007; 55:111–118.
26. Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(suppl 2):ii3–ii21.
27. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1–4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008; 7: 1–11.
28. Fenoll A, Granizo JJ, Aguilar L, Gimenez MJ, Aragonese-Fenoll L, Hanquet G, et al. Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1012-1020.
29. Centers for Disease Control and Prevention. ABCs Report: *Streptococcus Pneumoniae*. 2010[cited 2011 December]. Available from: <http://www.cdc.gov/abcs/index.htm./15/11/2012>.
30. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(11):1596–1600.
31. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (EARSS, 2010). Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SU_R_AMR_data.pdf/12/5/2012.
32. Borg MA, Tiemersma E, Scicluna E, Sande-Bruinsma N, Kraker M, Monen J, et al. ARMed Project members and collaborators. Prevalence of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates reported by laboratories in the southern and eastern Mediterranean region. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:232–237.
33. Marchese A, Esposito S, Barbieri R, Bassetti M, Debbia E. Does the adoption of EUCAST susceptibility breakpoints affect the selection of antimicrobials to treat acute community-acquired respiratory tract infections *BMC Infectious Diseases.* 2012; 12:181.
34. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillanceeurope-2012.pdf/8/3/2013/>.
35. Fürst J, Čižman M, Mrak J, Kos D, Campbell S, Coenen S, et al. The influence of a sustained multifaceted approach to improve antibiotic prescribing in Slovenia during the past decade: findings and implications. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13(2):279-289.
36. Setchanova L, Kostyanov T, Alexandrova A, Mitov I, Nashev D, Kantardjiev T. Microbiological characterization of *Streptococcus pneumoniae* and non-typeable *Haemophilus influenzae* isolates as primary causes of acute otitis media in Bulgarian children before the introduction of conjugate vaccines. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013; 12:16.



37. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARS, Annual report 2013.
38. Linares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 402-410.
39. Hernández M, Mejía GI, Trujillo H, Robledo J. Effectiveness of the antibiotics chloramphenicol and rifampin in the treatment of *Streptococcus pneumoniae*-induced meningitis and systemic infections. *Biomedica.*2003; 23(4):456-461
40. Chen YY, Yao SM, Chen YH, Jiang SF, Kuo TL, Chen TL, et al. Antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* in Taiwan, 2008-2012. *Taiwan Epidemiol Bull.* 2013; 29(19):232-251.
41. Manning L, Laman M, Greenhill AR, Michael A, Siba P, Mueller I, Davis TM. Increasing chloramphenicol resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Papua New Guinean children with acute bacterial meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(9):4454-4456.
42. Neves FPG, Castro Abreu Pinto T, Alves Corrêa A, Barreto R, Moreira G, Rodrigues-Gomes H, et al. Nasopharyngeal carriage, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* among children from Brazil before the introduction of the 10-valent conjugate vaccine. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:318.
43. Maraki S, Papadakis IS. Antimicrobial resistance trends among community-acquired respiratory tract pathogens in Greece, 2009.:2012. *The Scientific World Journal*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/941564>./12/9/2011.
44. Van Bambeke F, Reinert R, Appelbaum P, Tulkens PM, Peetermans WE. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections. *Drugs.* 2007; 67:2355–2382.
45. Rantala M, Huikko S, Huovinen P, Jalava J. Prevalence and Molecular Genetics of Macrolide Resistance among *Streptococcus pneumoniae* Isolates Collected in Finland in 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10):4180–4184.



PHENOTYPIC METHODS AND THEIR IMPORTANCE IN THE DETECTION OF PENICILIN RESISTANT *STREPTOCOCCUS* *PNEUMONIAE*

Osmanović L.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a leading cause of upper respiratory tract infections (sinusitis, otitis) and conjunctivitis. It is also the most common cause of community-acquired pneumonia, bacterial meningitis and sepsis. Resistance to penicilin is mediated in pneumococcus by change of locus. Locus for penicilin is so called penicilin binding proteins (PBP). Pneumococci have 6 of such molecules:

1A, 1B, 2A, 2B, 2X and 3, and resistant strings have changed PBP molecules which show lower affinity for penicilin. Change of molecules of PBP comes from great tendency of pneumococcus to transform genes, that is to build in foreign DNA from the environment into its own genome. Foreign DNA comes from viridans streptococci with whom pneumococci share habitat in the mucus of upper respiratory pathways. The aim of this thesis is to check the frequency of the isolate of *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicilin, and to show and compare phenotype methods of detection of pneumococci resistance to penicilin. Research has been done based on the data of patients in the period from 01.01.2016 to 01.01.2017 in OJ Klinička Mikrobiologija UKC Sarajevo. Diffusion test, E test and automated VITEK 2 system were used to determine phenotypes of resistant pneumococci.

Corresponding author:

*Lejla Osmanović, MA graduate eng. of MLD
Clinical Center of the University of Sarajevo
O.J. Clinical microbiology
E-mail: osmanovic_lejla@yahoo.com
Tel: 0038761/218-002*



ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA KAO RIZIK U PREVENCIJI INFEKCIJA

Rusmira Hasandić-Mehmedagić

Sažetak

Antibiotska rezistencija je prirodni fenomen koji predstavlja otpornost bakterija na antibiotike, odnosno njihova sposobnost rasta u prisustvu antibiotika. Razvoj antibiotske rezistencije primjer je prirodne selekcije pri čemu prisutnost antibiotika predstavlja selektivni pritisak, a samo one bakterije koje posjeduju gene za otpornost na antibiotik će preživjeti.

Postoje dva tipa rezistencije: primarna, koja nastaje kao posljedica nepostojanja ciljnog mjesta za antibiotik u bakteriji, i sekundarna koja nastaje kao posljedica mutacije bakterijskog genoma ili horizontalnog prijenosa gena (transformacija, transdukcija i konjugacija). Mehanizmi djelovanja sekundarne rezistencije su enzimatska modifikacija antibiotika, promjena u molekularnoj strukturi ciljnog mjesta za antibiotik, promjena propusnosti bakterijske vanjske membrane i ubrzano izbacivanje antibiotika iz stanice.

Bakterije predstavljaju glavne protagoniste ovog fenomena zbog kojih ljudi trpe direktne negativne posljedice koje dovode do infekcija kao što su: gonoreja, pneumonija, tuberkuloza itd., koje mogu dovesti do komplikacija. Zbog toga je važno znati zašto i na koji način bakterije postaju sve otpornije na antibiotike. Cilj ovog rada je ukratko predstaviti antibiotsku rezistenciju, a potom ukazati na važnost prepoznavanja istog, sve opasnijeg problema te predložiti neke strategije pomoću kojih bi se on u budućnosti mogao reducirati. Kako bi se problem antibiotske rezistencije u budućnosti smanjio, potrebno je poduzeti određene mjere poput smanjenja upotrebe antibiotika, edukacije stanovništva, poticanja istraživanja u svrhu boljeg razumijevanja mehanizama antibiotske rezistencije i razvijanja novih, učinkovitijih antibiotika na koje bakterije neće biti otporne.

1.UVOD

Antibiotici su spojevi koji mogu potpuno uništiti patogene mikroorganizme ili inhibirati proces rasta i razmnožavanja bakterija. Osnovna karakteristika antibiotika je selektivna toksičnost što znači da su toksični za bakterije, a malo ili nikako toksični za domaćina. Selektivna toksičnost je obično relativna, a ne apsolutna, što znači da antibiotik u koncentracijama koje domaćin toleriše može uništiti bakteriju (1). Antibiotici mogu biti prirodni (spojevi nekih bakterija i gljiva), polusintetski (tvari koje su nastale prirodnim putem, ali su hemijski djelimično izmijenjene)

Autor za korespondenciju:

Rusmira Hasandić-Mehmedagić dipl.

Ing. MLD

Kantonalna bolnica Zenica

Služba za mikrobiologiju

E-mail rusmira.hasandic@hotmail.com

Tel: 0038761/ 368-214



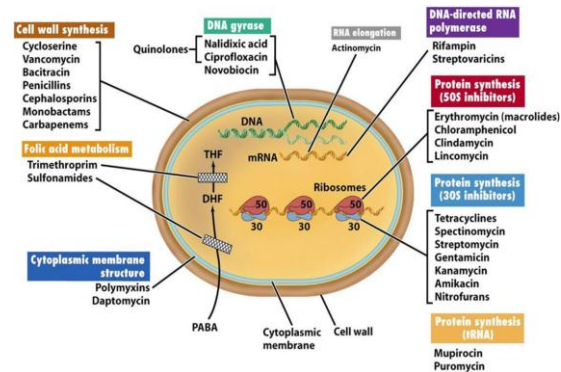


ili sintetski (tvari koje su sintetizirane potpuno umjetnim putem) spojevi (2). Prvi antibiotik otkriven je 1928. godine kada je škotski bakteriolog Alexander Fleming uočio da je Petrijeva zdjelica na kojoj su bile uzgojene kolonije bakterije *Staphylococcus aureus*, kontaminirana plijesni. U području oko plijesni nisu rasle bakterijske kolonije stafilokoka što je navodilo na zaključak da plijesan, koja je identificirana kao *Penicilium notatum*, u medij ispušta određenu tvar koja inhibira rast i razvoj bakterija. Ta tvar antibakterijskog učinka nazvana je penicilin. Sljedeći važni koraci bili su pročistiti penicilin, proizvesti ga u velikim količinama te dokazati njegov potencijal za kliničku primjenu što su u konačnici i postigli znanstvenici Ernst Boris Chain i Howard Walter Florey. Godine 1945. Alexander Fleming, Ernst Boris Chain i Howard Walter Florey osvojili su Nobelovu nagradu za „otkriće penicilina i primjenu njegovih ljekovitih svojstava u različitim infektivnim bolestima. Do razdoblja Drugog svjetskog rata, penicilin je ušao u široku upotrebu, a u to vrijeme su ga nazivali „čudotvornim lijekom“. Nakon otkrića penicilina, u vremenskom periodu između 1950-ih i 1960-ih, uslijedilo je „zlatno razdoblje“ antibiotika u kojem je otkrivena polovica antibiotika koji su danas u upotrebi (2).

Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterije

Antibiotici mogu djelovati na različite procese u bakterijskoj stanici i na taj način mogu utjecati na strukturni integritet bakterijske stanice (inhibicija sinteze stanične stijenke i inhibicija funkcije citoplazmatske membrane) ili mogu prekinuti osnovne metaboličke

aktivnosti (inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, proteina i bitnih metabolita). Specifična aktivnost antibiotika, kao i njegov način djelovanja, određeni su biološkim svojstvima bakterija (7).



Slika 1. Mehanizmi djelovanja antibiotika na bakterijsku stanicu (Izvor:internet)

Inhibicija sinteze stanične stijenke

Stanična stijenka je ovojnica koja okružuje bakterijsku stanicu te joj osigurava stalan oblik i zaštitu od negativnih vanjskih utjecaja kao što su mehaničke ozljede i promjena osmotskog pritiska (4). Bakterijska stanična stijenka je građena od peptidoglikana, odnosno od linearni polisaharidnih lanaca koji su unakrsno povezani kratkim peptidima. Na temelju građe stanične stijenke, bakterije dijelimo na Gram-pozitivne, one koje se oboje bojom kristal violet i sadrže veći udio mureina, i Gram-negativne, one koje se ne oboje bojom kristal violet i sadrže manji udio mureina u sastavu stanične stijenke. Neke bakterije, poput mikoplazmi, nemaju staničnu stijenku (11).

Dvije skupine antibiotika koji inhibiraju sintezu bakterijske stanične stijenke su β -laktamski antibiotici i glikopeptidni antibiotici. Beta-laktamski antibiotici se



vezuju na proteine koji vežu penicilin i na taj način, preko procesa transpeptidacije, inhibiraju sintezu stanične stijenke. β -laktamski antibiotici uključuju peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme (5). Glikopeptidni antibiotici se vezuju na D-alanil D-alanin u peptidnom lancu prekursora jedinice peptidoglikana. Jedan od najpoznatijih glikopeptidnih antibiotika je vankomicin. Velika prednost antibiotika koji inhibiraju sintezu stanične stijenke je to što se primjenom ovih antibiotika postiže relativno visoka selektivna toksičnost jer eukariotske stanice ne sadrže peptidoglikan pa antibiotici ciljano djeluju na bakterijske stanice. Upravo se iz tog razloga ova skupina antibiotika vrlo često koristi (4).

Inhibicija funkcije stanične membrane

Citoplazma bakterijske stanice okružena je staničnom membranom koja služi kao selektivna permeabilna barijera, vrši aktivni transport i regulira unutarnji sastav bakterijske stanice (5). Antibiotici ove skupine mogu djelovati na različite načine, a samo neki od brojnih su narušavanje funkcionalnog integriteta stanične membrane, promjena permeabilnosti stanične membrane, djelovanje antibiotika na spojeve koji su karakteristični za građu bakterijske stanične membrane. Najpoznatiji primjer antibiotika iz ove skupine su polimiksini koji dovode do povećane propusnosti stanične membrane što u konačnici može rezultirati oštećenjem ili smrću bakterijske stanice. Antibiotici koji inhibiraju funkcije membrane

bakterijskih stanica pokazuju visoku selektivnu toksičnost koja se temelji na razlici u građi stanične membrane eukariotske i prokariotske stanice (16).

Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline su biološke makromolekule, odnosno polimeri nukleotida čija je osnovna funkcija pohrana genetičke informacije te njezina ekspresija. U svim stanicama postoje dva osnovna tipa nukleinskih kiselina: deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA) (5). Kinoloni i rifampicin su najpoznatiji antibiotici koji djeluju preko inhibicije sinteze nukleinskih kiselina. Fluorokinoloni (fluorirani kinoloni) inhibiraju bakterijsku topoizomerazu II (DNA girazu) i topoizomerazu IV. Inhibicijom topoizomeraze II onemogućena je relaksacija pozitivno zavijene DNA što je potrebno za replikaciju i transkripciju, dok se inhibicijom topoizomeraze IV postiže sličan, ali sporiji učinak. Fluorokinoloni mogu pri visokim koncentracijama inhibitorno djelovati na topoizomeraze u ljudskim stanicama. Rifampicin inhibira DNA-ovisnu RNA polimerazu i na taj način sprječava sintezu RNA te dovodi do smrti bakterijske stanice (9).

Inhibicija sinteze proteina

Proteini su biološke makromolekule, građene od aminokiselina čiji je slijed u proteinu određen slijedom nukleotida u DNA, koje su važne za strukturu, funkciju i regulaciju stanica (15). Najpoznatiji antibiotici koji djeluju preko inhibicije sinteze proteina su aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, streptogramin i



Linkozamidi (10). Aminoglikozidi se vezuju na 30S podjedinicu ribosoma i mogu inhibirati sintezu proteina na više načina: sprječavanjem nastajanja inicijacijskog kompleksa, pogrešnim čitanjem genetičkog koda što u konačnici rezultira sintezom nefunkcionalnih proteina ili nastankom monosoma koji ne mogu vršiti sintezu proteina. Tetraciklini se vezuju na 30S podjedinicu ribosoma i blokiraju vezanje aminoacil-tRNA te na taj način inhibiraju sintezu proteina. Kloramfenikol se vezuje na 50S podjedinicu ribosoma i inhibira sintezu proteina na način da sprječava peptidil-transferaznu aktivnost ribosoma. Makrolidi se vezuju na 50S podjedinicu i sprječavaju translokaciju aminoacila. Makrolidi, streptogramini B i linkozamidi imaju sličan mehanizam djelovanja (21).

Inhibicija sinteze važnih metabolita

Dva najpoznatija primjera antibiotika iz ove skupine su sulfonamidi i trimetoprim. Oba antibiotika inhibiraju određene korake u metabolizmu folne kiseline koja je važna za sintezu bakterijskih nukleinskih kiselina (3). Prirodni supstrat za enzim dihidropteroat sintazu je paraaminobenzojeva kiselina, koja je dio metaboličkog puta folne kiseline, ali se sulfonamidi većim afinitetom vežu na enzim i na taj ga način kompetitivno inhibiraju. Trimetoprim inhibira bakterijsku dihidrofolat reduktazu. Istodobna primjena sulfonamida i trimetoprima daje sinergistički učinak, odnosno učinak kombinacije tih dvaju antibiotika nadmašuje aditivni učinak pojedinih komponenti (6).

Antibiotska rezistencija

Antibiotska rezistencija je otpornost bakterija na djelovanje antibiotika odnosno sposobnost rasta bakterija u prisutnosti antibiotika. Antibiotska rezistencij je prvi put zabilježena 1940. godine kada su biohemičari Edward Penley Abraham i Ernst Boris Chain uočili soj bakterije *Escherichia coli* koji je sintetizirao penicilinaze i na taj način inaktivirao penicilin. Od tog trenutka nadalje, otkrivao se sve veći broj slučajeva otpornosti na različite skupine antibiotika što je u konačnici dovelo do toga da je antibiotska rezistencija smatrana „modernim fenomenom“ koji se javio kao rezultat korištenja antibiotika (18). Znanstvenici su 2011. godine proveli istraživanje u kojem su analizirali uzorke DNA prikupljenih na području kanadskog Yukona- područja „vječnog leda“ koji potječe iz razdoblja kasnog pleistocena. Cilj istraživanja bio je ispitati podrijetlo antibiotske rezistencije, odnosno odrediti je li ona doista „moderni fenomen“ ili je postojala i davno prije samih početaka ljudske upotrebe antibiotika. Sekvenciranjem bakterijskih genoma utvrđeno je da su bakterije, stare približno 30 000 godina, sadržavale gene za otpornost na β -laktame, tetracikline i glikopeptidne antibiotike. Prema tome, te su bakterije bile otporne na mnoge prirodne antibiotike kao i na polusintetičke antibiotike slične strukture. Dakle, antibiotska rezistencija nije „moderni fenomen“ već drevni prirodni fenomen, a geni za otpornost na antibiotike su prethodili ljudskoj upotrebi antibiotika (3). Razvoj bakterijske otpornosti na antibiotike je klasičan primjer prirodne selekcije gdje prisutnost antibiotika predstavlja selektivni pritisak,



a samo one bakterije koje posjeduju gene za otpornost na taj antibiotik će preživjeti. Prema tome, možemo definirati antibiotski rezistom kao zajednički naziv za sve gene odgovorne za rezistenciju koje pronalazimo u okolišu, a za očekivati je da će se zastupljenost i tip rezistencije mijenjati ovisno o različitim okolišima. Postoje dva tipa rezistencije: primarna (urođena ili intrinzična) te sekundarna (stečena). Primarna (urođena ili intrinzična) rezistencija je prirodno nasljedno svojstvo nepostojanja ciljnog mjesta za antibiotik u mikroorganizmu. Primjer prirodne rezistencije je otpornost mikoplazmi na β -laktamske antibiotike. Mikoplazme su rod bakterija čija je karakteristika nepostojanje stanične stijenke i to ih svojstvo čini prirodno otpornima na β -laktamske antibiotike (14).



Slika 2. Antibioticska rezistencija (preuzeto sa https://www.pig333.com/articles/antibiotic-resistance-frequently-asked-questions-1-of-2_12497/)

Tabela 1. Prikaz početka primjene određenih antibiotika te identifikacija bakterija otpornih na određene antibiotike (Prilagođeno prema <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>)

Antibiotik	Početak primjene antibiotika	Bakterija otporna na antibiotik	Identifikacija bakterije otporne na antibiotik
Penicilin	1941.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1942. 1967. 1976
Vankomicin	1958.	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	1988. 2002.
Meticilin	1960.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1960.
Treća generacija cefalosporina	1980. (cefotaksim)	<i>Escherichia coli</i>	1983.
Azitromicin	1980.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2011.
Imipenem	1985.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1996.
Ciprofloksacin	1987.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2007.
Daptomicin	2003.	<i>Staphylococcus aureus</i>	2004.
Ceftazimid/avibaktam	2015.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2015.



Sekundarna rezistencija

Kada bakterija koja je bila osjetljiva na antibiotik postane otporna javlja se sekundarna ili stečena rezistencija. Sekundarna rezistencija se može razviti kao posljedica: mutacije bakterijskog genoma ili horizontalnog prijenosa gena (transformacija, transdukcija i konjugacija) (12). Iako je transformacija najjednostavniji mehanizam horizontalnog prijenosa gena, samo mali broj klinički značajnih bakterija može steći gene za otpornost na antibiotike prirodnom transformacijom. Transformacija je glavni put širenja rezistencije na penicilin u *Streptococcus pneumoniae* stvaranjem „mozaičnih gena za PBP“. „Mozaični geni za PBP“ kodiraju proteine koji imaju smanjeni afiniteta vezivanja na β -laktamske antibiotike. Transdukcija je proces u kojem bakteriofagi, virusi koji inficiraju bakterije, prenose gene iz jedne bakterije u drugu. Budući da se bakteriofagi vezuju na specifične receptore na površini bakterijske stanice, transdukcija je visoko specifičan proces. Transdukcija je glavni mehanizam kojim *Staphylococcus aureus* prima gene za rezistenciju. Konjugacija je proces prijenosa plazmida ili transpozona iz jedne bakterije u drugu koji zahtijeva direktan kontakt između dvije stanice. Istraživanja pokazuju da je učestalost konjugacije u prirodnim uvjetima puno veća nego učestalost konjugacije u laboratorijskim uvjetima. Iako je konjugacija glavni mehanizam horizontalnog prijenosa gena, novija istraživanja pokazuju da je značaj transformacije i transdukcije, u kontekstu stjecanja antibiotske rezistencije kod

bakterija, puno veći nego što se dosad mislilo (19).

Kako bi se bakterije zaštitile od djelovanja antibiotika, kod njih su razvijeni brojni mehanizmi rezistencije koji se dijele u četiri kategorije: enzimatska modifikacija antibiotika, promjena u molekularnoj strukturi ciljnog mjesta za antibiotik, promjena propusnosti bakterijske vanjske membrane te ubrzano izbacivanje antibiotika iz stanice (10). U bakterijskoj stanici može u isto vrijeme biti aktivno nekoliko mehanizama rezistencije što dovodi do rezistencije visokog stepena (17).

Enzimatska modifikacija antibiotika temelji se na sposobnosti bakterija da sintetiziraju enzime kojima će razgraditi ili inaktivirati antibiotike (13). Najčešće biohemijske reakcije koje kataliziraju antibiotike su: adenilacija, acetilacija ili fosforilacija antibiotika čime se smanjuje afinitet antibiotika za ciljnu molekulu. Enzimatska modifikacija antibiotika je najznačajniji mehanizam bakterijske rezistencije na β -laktamske antibiotike, aminoglikozide i kloramfenikol. Rezistencija na β -laktamske antibiotike nastaje uglavnom zbog stvaranja β -laktamaza, enzima koji kidaju amidnu vezu u β -laktamskom prstenu i na taj način inaktiviraju antibiotike. *Staphylococcus aureus* je bakterija kod koje je primjećen ovaj tip mehanizma rezistencije na penicilin i cephalosporin (26).

Promjena u molekularnoj strukturi ciljnog mjesta za antibiotik predstavlja mehanizam kod kojeg antibiotik ulazi u stanicu i dolazi do ciljnog mjesta ali ne



može djelovati na njega zbog promjene ciljnog mjesta. Ovaj mehanizam antibiotske rezistencije se javlja za β -laktamske antibiotike, tetracikline, makrolide, linkozamide, streptogramine i kinolone (22).

Promjena propusnosti bakterijske vanjske membrane predstavlja mehanizam kojim gram-negativne bakterije sprečavaju ulazak antibiotika u stanicu. Ovaj mehanizam je karakterističan za gram negativne bakterije jer gram pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu koja ima ulogu permeabilne barijere koja sprečava ulazak velikih hidrofobnih molekula, dok je ulazak hidrofilnih antibiotika osiguran postojanjem porina (proteinskih kanala koji su ispunjeni vodom). Ovaj je mehanizam izražen pri rezistenciji gram negativnih bakterija na β -laktamske antibiotike, aminoglikozide, kloramfenikol (24).

Ubrzano izbacivanje antibiotika iz stanice predstavlja mehanizam koji omogućava bakterijama da kroz transportne crpke aktivno izbacuju antibiotik iz stanice brže nego što se on može nakupiti u stanici da bi dostigao djelotvornu koncentraciju. Ovaj tip mehanizma rezistencije prisutan je kod bakterija koje su otporne na tetracikline i makrolide (26).

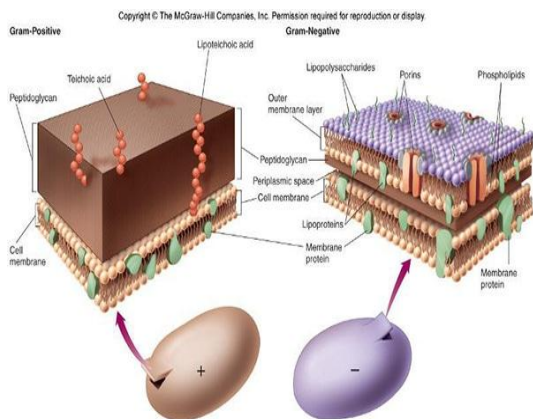
2. METODE TESTIRANJA

Metode koje se bave ispitivanjem osjetljivosti bakterija na antibiotike imaju za cilj predvidjeti da li će bakterija reagirati na primijenjeni antibiotik. Cilj metoda je prikupljene podatke usmjeriti ka sprečavanju širenja otpora bakterija na antibiotike i na taj način olakšati liječenje raznih infekcija. Neki primjeri metoda testiranja osjetljivosti antibiotika su: (18)

a. METODA RAZRJEĐENJA

Metoda razrjeđivanja bujona uključuje podvrgavanje izolata bakterije nizu različitih koncentracija antibiotika u bujonskoj sredini. Dvije su vrste bujon metode razrjeđivanje i kod obje najniža koncentracija kod koje je izolat potpuno inhibiran označava se kao minimalna inhibitorska koncentracija ili MIC (27).

Metoda razrjeđivanja agara je slična razrjeđivanju bujona. Postupak razrjeđivanja agara slijedi princip uspostavljanja najniže koncentracije razrijeđenog antibiotika, odnosno koncentracije gdje je rast bakterije još uvijek inhibiran (27).



Slika 3. Razlika u građi stanične stijenke Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (Preuzeto sa <https://microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>)



b. DISK-DIFUZIJSKA METODA

Mueller-Hinton agar obično se koristi kao medij za rast i on se prvo uniformno zasijava kroz ploče sa izolatom razrijeđenim u standardnu koncentraciju. Prethodno impregnirani standardnom koncentracijom određenog antibiotika, te komercijalno pripremljeni diskovi su raspršeni i lagano utisnuti na površinu agara. Test započinje odmah s raspršivanjem od diska, stvaranjem istovremeno gradijent antibiotičkih koncentracija tako da se najviša koncentracija nalazi najbliže disku. Nakon nekog vremena promatra se rast bakterija na pojedinačnim diskovima. Ako je izolat osjetljiv na antibiotik oko određenog diska uočava se zona bez rasta koja se naziva zona inhibicije jer označava minimalnu koncentraciju antibiotika dovoljnu da spriječi rast bakterija. Primjer *Escherichia coli* ima zonu inhibicije 10.1mm oko ampicilina (25).

b. E-TEST

Test koji koristi plastičnu test traku s postepeno padajućom vrijednosti koncentracije određenog antibiotika. Na traci se nalazi numerička vrijednost koncentracije antibiotika., te se tako ovim testom osigurava kvantitativne rezultate antibiotske rezistencije kliničkih izolata (20).

c. AUTOMATIZIRANA METODA

Osiguravaju pripremljene i oblikovane ploče za mikrodiluciju, instrumentaciju i automatsko očitavanje ploča. Većina takvih automatiziranih sustava za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike

osigurava i automatsku inokulaciju, čitanje te tumačenje. Velika im je prednost što su brzi, ali velika je mana što su skupi (28).

e. TESTOVI SPECIFIČNI ZA MEHANIZAM REZISTENCIJE

Test se obavlja na temelju otkrivenog prisutnog mehanizma rezistencije. Kao što se detekcija beta laktamaza može provesti upotrebom kromogenog testa cefalosporinaze (29).

f. GENOTIPSKE METODE KAO ŠTO SU PCR I DNA HIBRIDIZACIJSKE METODE

Često rezistencija ovisi i rezistentnim genima stoga postoji metoda testiranja koja koristi takve specifične gene (29).

Neke od najčešćih molekularnih tehnika za otkrivanje otpornosti na antibiotike:

a. PCR je jedna od najčešće upotrebljivanih molekularnih tehnika za detekciju određene DNA sekvence. U tu je tehniku uključeno nekoliko ciklusa denaturacije uzorka DNA, žarenje specifičnih početnica na ciljnu sekvencu, i produživanje tih sekvenci olakšano termostabilnim polimerazama dovodeći do replikacije i duplikacije DNA sekvenci (29).

b. DNA hibridizacija temelji se na specifičnim parovima purina i pirimidina u DNA. Stoga se sonda označena s poznatim slijedom baza može spariti sa denaturanom DNA iz uzorka. Pojavom ove hibridizacije sonda se označava sa signalnim radioaktivnim izotopom ili enzimom, a ukoliko nema ciljnu sekvencu ili izolat ne sadrži specifični gen ne dolazi do otkrivanja signala (29).



3. ZAKLJUČAK

Prije otkrića antibiotika mnoga zarazna oboljenja su bila teško izlječiva, pa i neizlječiva. Sa pronalaskom antibiotika mnoga infektivna oboljenja postala su izlječiva. Međutim, zbog dugotrajnog i nepravilnog upotrebljavanja antibiotika došlo je do pojave veoma visokog procenta sojeva različitih vrsta mikroorganizama otpornih na jedan antibiotic ili na više antibiotika (2).

Antibiotska rezistencija je prirodni fenomen koji predstavlja otpornost bakterija na antibiotike, odnosno njihova sposobnost rasta u prisustvu antibiotika (3). Razvoj antibiotske rezistencije primjer je prirodne selekcije pri čemu prisutnost antibiotika predstavlja selektivni pritisak, a samo one bakterije koje posjeduju gene za otpornost na antibiotik će preživjeti (14). Razvoj bakterijske otpornosti na antibiotike je klasičan primjer prirodne selekcije gdje prisutnost antibiotika predstavlja selektivni pritisak, a samo one bakterije koje posjeduju gene za otpornost na taj antibiotik će preživjeti. Prema tome, možemo definirati antibiotski rezistenciju kao zajednički naziv za sve gene odgovorne za rezistenciju koje pronalazimo u okolišu, a za očekivati je da će se zastupljenost i tip rezistencije mijenjati ovisno o različitim okolišima (18).

Antimikrobna rezistencija kod bakterijske patogenosti je svjetski izazov povezan s visokim morbiditetom i mortalitetom. Obrasci rezistentnosti na više lijekova kod gram-pozitivnih i -negativnih bakterija doveli su do infekcija koje se teško liječe ili čak neizlječive konvencionalnim antimikrobnim lijekovima. Budući da

nedostaje rana identifikacija uzročnika mikroorganizama i njihovih obrazaca osjetljivosti na antimikrobne lijekove kod pacijenata s bakteremijom i drugih ozbiljnih infekcija (10). U mnogim zdravstvenim ustanovama antibiotici širokog spektra se slobodno i uglavnom nepotrebno koriste. Dolazi do dramatičnog povećanja otpornosti u nastajanju i, u kombinaciji sa lošom praksom kontrole infekcija, rezistentne bakterije se lako mogu prenijeti na druge pacijente i okolinu. Dostupnost ažuriranih epidemioloških podataka o antimikrobnoj rezistenciji kod bakterijskih patogena koji se često susreću bit će korisna ne samo za donošenje odluka o strategijama liječenja, već i za osmišljavanje učinkovitog programa upravljanja antimikrobima u bolnicama. Postoje izazovi u borbi protiv bakterijskih infekcija i pratećih bolesti i trenutni nedostatak učinkovitih lijekova, nedostatak uspješnih mjera prevencije i samo nekoliko novih antibiotika u kliničkom procesu zahtijevat će razvoj novih opcija liječenja i alternativnih antimikrobnih terapija (28).

Pronalaženje strategija protiv razvoja rezistencije na antibiotike glavni je globalni izazov za zajednicu prirodnih nauka i za javno zdravlje.



4. LITERATURA

1. Wise R, Piddock LJV. British Society of Antimicrobial Chemotherapy (BSAC). The BSAC Working Party on the Urgent Need Regenerating Antibacterial Drug Discovery Development. <http://antibiotic-action.com/wp-content/uploads/2011/07/TUN-Report.pdf> (6 September 2015, date last accessed).
2. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009;64 Suppl 1: i29–36.
3. Department of Health. Annual Report of the Chief Medical Officer. Volume 2. Infections and the Rise of Antimicrobial Resistance. Department of Health, 2011. <http://media.dh.gov.uk/network/357/files/2013/03/CMOAnnual-Report-Volume-2-20111.pdf> (6 September 2015, date last accessed).
4. Livermore D. Can better prescribing turn the tide of resistance? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:73–8.
5. ECDC: The bacterial challenge: time to react. A Call to Narrow the Gap Between Multidrug-Resistant Bacteria in the EU and the Development of New Antibacterial Agents. ECDC/EMA Joint Technical Report, 2009. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_T Rev. 2010;74\(3\):417-433](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_T Rev. 2010;74(3):417-433).
6. Davies J. Where have All the Antibiotics Gone?. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, 2006;17(5):287-290.
7. D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457-461.
8. Demain AL. Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev.* 2009;29(6):821-842.
9. Epanand RM, Walker C, Epanand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(5):980-98.
10. Fief CA, Hoang KG, Phipps SD, Wallace JL, Dewese JE. Examining the Impact of Antimicrobial Fluoroquinolones on Human DNA Topoisomerase II α and II β . *ACS Omega.* 2019;4(2):4049-4055.
11. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health.* 2017;10(4):369-378.
12. González-Bello C, Antibiotic adjuvants-A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 2017 vol.27;18 pp.4221-4228.
13. Haaber J, Penadés JR, Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2017;25(11):893-905.
14. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(9):a025320.
15. Kantar Public Brussels. Special Eurobarometer 478 – Wave EB90.1 –
16. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2017;33(3):300-305.
17. Klein YE, Van Boeckel PT, Martinez M.E, Pant S, Gandra Sumanth, Levin A.S, Goossens H, Laxminarayan R, 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.



18. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?, *Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (2017), pp. 135-145.
19. Machowska A, Stålsby Lundborg C. Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;16(1):27.
20. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1771-1777.
21. Munita JM, Arias CA, Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
22. Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med*. 2002;252(2):91-106.
23. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A Classification of Beta-Lactamases and Penicillin Binding Proteins Using Ligand-Centric Network Models, 2015. *PLoS ONE* 10(2):e0117874.
24. Davey P, Brown E, Charani E, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;4:CD003543.
25. Abel Zur Wiesch P, Kouyos R, Abel S, et al. Cycling empirical antibiotic therapy in hospitals: meta-analysis and models. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004225.
26. Public Health England. Start Smart—Then Focus. Antimicrobial Stewardship Toolkit for English Hospitals. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/417032/Start_Smart_Then_Focus_FINAL.PDF (6 September 2015, date last accessed).
27. Schuetz P, Müller B, Christ-Crain, et al. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;9: CD007498.
28. Drobniowski FA, Watterson SA, Wilson SM, et al. A clinical, microbiological and economic analysis of a national UK service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 2000;49:271–8.
29. Greatorex J, Ellington MJ, Köser CU, et al. New methods for identifying infectious diseases. *Br Med Bull* 2014;112:27–35.



ANTIBIOTIC RESISTANCE AS A RISK IN INFECTION PREVENTION

Hasandić-Mehmedagić R.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a natural phenomenon that represents the resistance of bacteria to antibiotics, ie their ability to grow in the presence of antibiotics. The development of antibiotic resistance is an example of natural selection where the presence of antibiotics represents selective pressure, and only those bacteria that possess antibiotic resistance genes will survive.

There are two types of resistance: primary, which results from the absence of an antibiotic target site in the bacterium, and secondary, which results from a mutation in the bacterial genome or horizontal gene transfer (transformation, transduction and conjugation). The mechanisms of action of secondary resistance are enzymatic modification of the antibiotic, change in the molecular structure of the target site for the antibiotic, change in the permeability of the bacterial outer membrane, and accelerated ejection of the antibiotic from the cell.

Bacteria are the main protagonists of this phenomenon due to which people suffer direct negative consequences that lead to infections such as gonorrhoea, pneumonia, tuberculosis, etc. which can lead to complications. That is why it is important to know why and in what way bacteria are becoming more and more resistant to antibiotics. The aim of this paper is to briefly present antibiotic resistance, and then point out the importance of recognizing this increasingly dangerous problem and suggest some strategies by which it could be reduced in the future. In order to reduce the problem of antibiotic resistance in the future, certain measures need to be taken such as reducing antibiotic use, educating the population, encouraging research to better understand the mechanisms of antibiotic resistance and developing new, more effective antibiotics that bacteria will not resist.

Corresponding author:

Rusmira Hasandić-Mehmedagić
B.Sc. Ing. MLD
Cantonal Hospital Zenica
Department of Microbiology
Email rusmira.hasandic@hotmail.com
Tel: 0038761 / 368-214



ZNAČAJ PRAĆENJA SADRŽAJA TEŠKIH METALA U VODI ZA PIĆE I PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

Amra Salkić

Služba za hemijsku dijagnostiku, Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

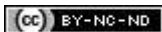
Sažetak

Otkriće metala i njihova upotreba predstavljaju prekretnicu u razvoju civilizacije. Život u 21. stoljeću je gotovo nezamisliv bez njih. Posuđe, prevozna sredstva, medicinski instrumenti, elektronski uređaji, te mnogi drugi predmeti koje svakodnevno upotrebljavamo su djelimično ili u potpunosti izrađeni od metala. Neki od njih poput bakra (Cu), željeza (Fe), cinka (Zn), selena (Se), mangana (Mn), hroma (Cr) i nikla (Ni) su, u manjim koncentracijama, čak i neophodni za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. Od 35 metala koji se mogu pronaći u prirodi, 23 se svrstavaju u skupinu teških metala. Termin “teški metali” se u literaturi koristi za metale čija je relativna gustoća veća od $\rho = 5 \text{ g/cm}^3$. Međutim u kolokvijalnom govoru, ovaj izraz se uglavnom upotrebljava za metale za koje je dokazano da djeluju toksično na živi svijet poput kadmija (Cd), olova (Pb) i žive (Hg). Arsen (As), iako polumetal, zbog izrazite toksičnosti se također ubraja u ovu skupinu. Toksično djelovanje teških metala je posebno izraženo zbog činjenice da se oni prilikom unošenja u (ljudski) organizam talože u jetri, plućima, bubrezima, mozgu i drugim tkivima, te utječu na normalno odvijanje fizioloških procesa.

1.UVOD

Autor za korespondenciju:

*Amra Salkić, MA ing. hemije
Institut za zdravlje i sigurnost hrane
Zenica
Služba za hemijsku dijagnostiku
E-mail: amra.salkic@inz.ba
Tel: +387 61 325 476*

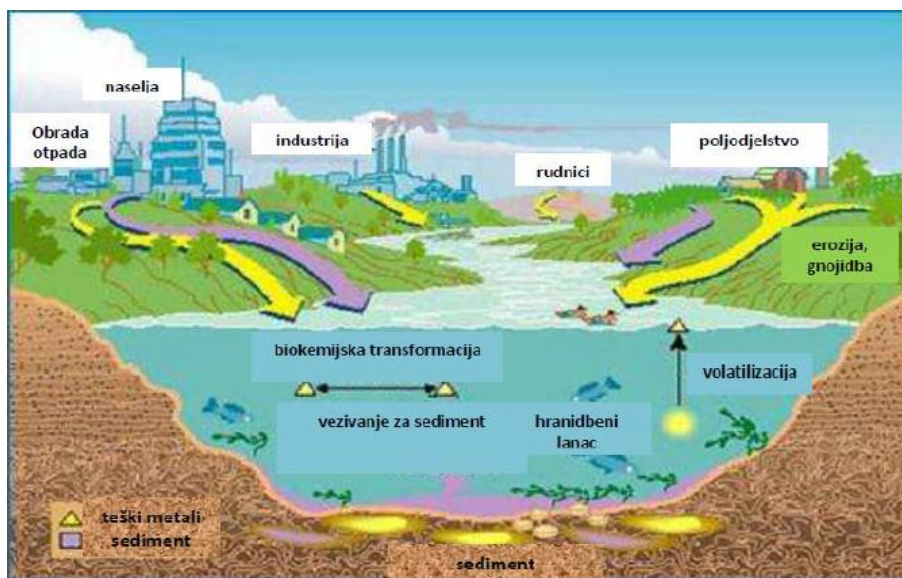


Sintagma “teški metali” se u naučnoj literaturi upotrebljava za hemijske elemente čija je relativna gustoća veća od $\rho = 5 \text{ g/cm}^3$. Teški metali se dijele u dvije skupine, na esencijalne i neesencijalne. Esencijalni elementi (Cu, Fe, Zn, Se, Mn, Cr, Ni) koji se još nazivaju i mikronutrijenti, su neophodni za normalno funkcionisanje fizioloških procesa u živim organizmima, stoga njihov nedostatak može dovesti do nastanka niza različitih poremećaja. Međutim, treba naglasiti da njihova “ljeovitost” ovisi od koncentracije koja se unese u organizam tako da unos navedenih elemenata veći od preporučene dnevne doze može dovesti do akutnog, odnosno hroničnog trovanja (1).



Neesencijalni elementi kao što su Cd, Pb, Hg i As su toksični za živi svijet i u vrlo malim koncentracijama, stoga će mehanizam njihovog djelovanja biti detaljnije opisan u narednim poglavljima. Teški metali su prisutni na Zemlji od njenog postanka. Njihova zastupljenost u Zemljinoj kori iznosi oko 25% gdje se nalaze uglavnom vezani u vidu hemijskih spojeva, većinom oksida i sulfida kao i karbonata, silikata i sulfata. Uslijed prirodnih procesa došlo je do rasprostranjivanja teških metala i u atmosferu i hidrosferu. Koncentracije teških metala koje su u okoliš dospijevale putem navedenih procesa nisu značajno utjecale na živi svijet.

Do preokreta dolazi početkom industrijalizacije i intenzivnog razvoja tehnologije uslijed čega je povećana proizvodnja i upotreba teških metala u svakodnevnom životu. Na naglo povećanje prirodne koncentracije teških metala u okolišu su također utjecale i nekontrolisana urbanizacija, poljoprivredna djelatnost, te razvoj cestovnog saobraćaja (Slika 1) (1, 2). Primjera radi, prometovanje automobila na benzinski pogon je pridonijelo kontaminaciji tla sa Pb, a razlog tome je upotreba benzina koje je sadržavalo tetraetil-olovo radi povećanja oktanskog broja. Zabrana upotrebe olovnog benzina je značajno utjecala na smanjenje emisije Pb (3).



Slika 1: Izvori teških metala u okolišu (2)



Emisijom iz antropogenih izvora, teški metali zagađuju zrak koji udišemo, vodu koju pijemo i tlo na kojem uzgajamo hranu. U organizam se unose prilikom ingestije kontaminirane vode za piće i prehrambenih proizvoda, ali i udisanjem i apsorpcijom kroz kožu u zavisnosti od hemijskog oblika u kojem se nalaze (4). Kada jednom dospiju u organizam, gotovo ih je nemoguće ukloniti zbog njihove sposobnosti da se akumuliraju u različitim ćelijama i tkivima, gdje mogu uzrokovati mutacije vezivajući se za proteine i nukelinske kiseline. Zabilježena su oštećenja pluća, jetre, bubrega i drugih vitalnih organa kao posljedica izloženosti teškim metalima, a dugotrajno taloženje u organizmu može postepeno dovesti do napredovanja degenerativnih neurološki procesa i promjena u muskulaturi, a koje su karakteristične za multipla sklerozu, mišićnu distrofiju, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest (5, 6). Također, teški metali imaju sposobnost da oponašaju djelovanje hormona zbog čega dolazi do poremećaja u endokrinom i reproduktivnom sistemu što na kraju može dovesti do razvoja kancera (4, 6).

IZVORI KONTAMINACIJE TEŠKIM METALIMA

Teški metali su sve prisutniji u okolišu, a pojavljuju se kao posljedica neantropogenog i antropogenog djelovanja. Neantropogena rasprostranjenost teških metala javila se kao posljedica erozije tla, ispiranjem iz formacija prirodnih stijena, koje se raspadaju i ustinjavaju pod različitim uvjetima, te uslijed erupcije vulkana pri čemu se teški metali emituju u

atmosferu odakle se talože na tlo (3). Kao što je ranije naglašeno, nagli porast koncentracija teških metala u ekosistemu javio se kao posljedica intenzivnog razvoja industrije i tehnologije, stoga danas većina depozicija teških metala potiče iz antropogenih izvora (Tabela 1).

Istraživanje koje je sprovedeno krajem 80-tih godina prošlog stoljeća pokazalo je da u ukupnim atmosferskim depozicijama na globalnom nivou antropogeni udio za Pb iznosi čak 96%, za Cd 85%, za As 61%, a za Hg 59%. Istovremeno, u Republici Hrvatskoj, 42,7% Pb je bilo antropogenog porijekla (emisija iz proizvodnih procesa); 59,4% As u atmosferi je dospijevalo prilikom izgaranja u termoenergetskim postrojenjima, dok je 43,2 % Hg i 39,4% Cd emitovano u atmosferu u industrijskim procesima izgaranja. Također, čak 28,5% antropogenog udjela Cd u atmosferi je poticalo od cestovnog saobraćaja (2).

S obzirom da je Bosna i Hercegovina u posljednjem desetljeću bila više puta izložena poplavama, te da je zbog klimatskih promjena očekivano da se taj trend nastavi, potrebno je spomenuti da do onečišćenje tla također može doći i tokom poplava. Razlog tome jeste izlivanje vode iz riječnih korita u koja se ulijevaju komunalne i industrijske otpadne vode, te nanosi mulja onečišćenog teškim metalima iz antropogenih i geogenih izvora nastalih erozivnim djelovanjem vode. Nakon velikih poplava koje su pogodile region na proljeće 2014. godine, sprovedeno je istraživanje u sklopu kojeg se ispitaio sadržaj teških metala na obalnom području rijeke Drave u Republici Hrvatskoj. Analize koje su urađene na



uzorcima tla i biljaka sa 7 lokacija su pokazale da su na pojedinim lokacijama premašene maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) za Pb i Cd. Razina Hg je bila u dozvoljenim granicama, dok je koncentracija As bila ispod limita detekcije (9).

Tlo predstavlja najugroženiji prirodni resurs, jer svi kontaminatni koji se ispuste u atmosferu i hidrosferu, na različite načine dospijevaju do tla gdje se talože. Procesi kontaminacije tla uglavnom teku sporo; u početnim fazama degradacije tlo ima sposobnost samoprečišćavanja, međutim ta osobina se gubi sa daljom kontaminacijom koja dovodi do djelimičnog, odnosno potpunog uništenja biljnog svijeta. Nažalost, prve posljedice je moguće primjetiti tek nakon izvjesnog perioda kada je revitalizacija tla otežana. Neophodno je naglasiti posljedice kontaminacije tla, te važnost njegovog očuvanja, jer tlo je izvor hrane za čovjeka. Prehranjujući se biljkama koje apsorbiraju i akumuliraju teške metale, kontaminacija se prenosi na životinje, a potom i na čovjeka koji se nalazi na vrhu hranidbenog lanca (3, 10).

Najugroženija su ona područja koja se nalaze u blizini industrijskih i urbanih centara, te velikih saobraćajnica, kao što je to u Bosni i Hercegovini područje grada Zenice. Ispitivanjem tla u okolini zeničke Željezare 2010. godine, utvrđeno je da koncentracije Pb (od 160,4 mg/kg do 340,3 mg/kg) i Cd (od 1,5 mg/kg do 4,5 mg/kg) značajno prelaze vrijednosti MDK, koja za Pb iznosi 100 mg/kg, a za Cd 1 – 2 mg/kg. Izuzev zeničke regije, istraživanja su pokazala da je u tlima na području Tuzle i Kaknja također prisutan sadržaj navedenih teških metala veći od

tolerantnih vrijednosti (10, 11). Iako su najviše ugrožena područja koja se nalaze u neposrednoj blizini izvora kontaminacije, ovisno od reljefa i ruže vjetrova, kontaminacija se može proširiti i na do 40 km udaljenosti od samog izvora.

MEHANIZAM DJELOVANJA TEŠKIH METALA NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Olovo

Prema urbanom mitu, oko kojeg se naučnici još uvijek spore, vjeruje se da je razlog pada Rimskog carstva prvenstveno trovanje olovom uslijed korištenja soli olovo acetata za zaslađivanje vina i za održavanje njegove svježine. Smatra se da je dugoročna upotreba ove soli izazvala demenciju kod mnogih rimskih imperatora. Dodavanje olovo acetata u vino je bila ilegalna, ali popularna praksa i u 18. i 19. stoljeću. Olovne soli su se u davniini dodavale u glazuru za keramiku, odakle su se uz prisustvo voćnih kiselina rastapale i miješale sa hranom koja se u njima pripremala i servirala (12).

Istraživanja su pokazala da olovo inhibiranjem porfobilinogen sintaze i ferohelataze, istovremeno sprječava stvaranje porfobilinogena i ugradnju željeza u protoporfirin IX, koji sprječava sintezu odnosno uzrokuje neefikasnu sintezu hema što kao posljedicu ima nastanak mikrocitne anemije. Djelujući kao analog kalcija, olovo remeti funkciju ionskih kanala zbog čega dolazi do promjena u kognitivnim funkcijama (12). Olovo se akumulira u skeletu, odakle se polahko otpušta u organizam – vrijeme poluraspada iznosi od 20 do 30 godina. Anorgansko olovo kod odraslih osoba ne



Tabela 1. Pregled potencijalnih antropogenih izvora teških metala (7,8)

Potencijalni izvori kontaminacije	Kontaminanti			
	Pb	Cd	Hg	As
Promentna infrastruktura:				
- ceste	X	X		
- aerodrome				
- ventilacioni sistemi u tunelima				
Termoelektrane	X	X		
Odlagališta otpada:				
- odlagališta inertnog i opasnog otpada	X	X	X	
- spaljivanje otpada				
- obrada komunalnih otpadnih voda				
Vojni poligoni	X	X	X	
Proizvodnja mineralnih gnojiva	X	X		
Talionice ruda	X	X		X
Naftne i plinske bušotine	X	X	X	
Naftovodi i plinovodi	X	X		
Metalna industrija	X	X		
Industrija stakla i staklenih vlakana	X	X	X	
Industrija keramike, crijepova i opeke	X	X	X	
Tvornica cementa	X		X	
Tvornice boja i lakova	X	X	X	X
Proizvodnja mikroelektronike	X	X		X
Proizvodnja pesticide, herbicida, fungicida	X			X



može proći kroz krvno – moždanu barijeru, međutim ova barijera kod djece nije dovoljno razvijena što djecu čini posebno osjetljivom na oštećenja mozga uzrokovana trovanjem olovom. Akutno trovanje tetrametil i tetraetil olovom koji imaju sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru dovodi do nastanka encefalopatije mozga (6).

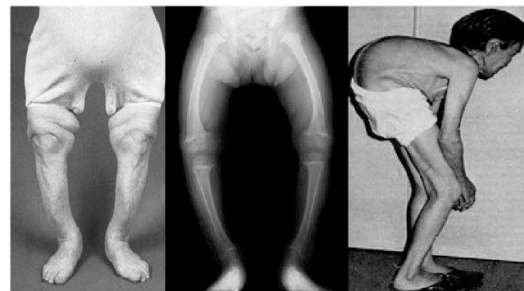
Kadmij

Na spisku koji je izradila Međunarodna agencija za istraživanje raka, kadmij i njegovi spojevi se nalaze u skupini 1 koju čine tvari za koje je dokazano da djeluju kancerogeno. Kadmij je nemoguće izlučiti iz organizma uslijed njegove reapsorpcije u bubrezima čime se njegovo štetno djelovanje na organizam dodatno naglašava. Čak i kratkotrajno udisanje kadmija može uzrokovati ozbiljna oštećenja pluća i iritaciju respiratornog sistema, dok ingestija veće doze dovodi do iritacije probavnog trakta što može rezultirati povraćanjem i dijarejom (1).

1912. godine u japanskoj prefekturi Toyama došlo je do masovnog trovanja lokalnog stanovništva kadmijumom prilikom ispuštanja otpadnih voda iz rudnika u rijeku. Stanje koje se razvilo uslijed trovanja, zbog jakih bolova u kičmenom stubu i zglobovima koje su osjećali oboljeli, je dobilo naziv “itai-itai” što u prevodu na bosanski jezik znači “boli, boli”.

Uslijed dugotrajne izloženosti izvoru kontaminacije, razvila su se ozbiljna oštećenja skeleta (Slika 2). Mehanizam djelovanja kadmija se odvija u dva koraka. Kadmij se vezuje za

metalotionein u krvi i putuje do glomerula u bubrezima. Kada dospije do proksimalnih cjevčica, otpušta se i taloži u bubrežnom korteksu. Kada razina kadmija dosegne toksični nivo, dolazi do nastanka poremećaja u metabolizmu kalcija, što za posljedicu ima hiperkalciuriju i stvaranje bubrežnog kamena. Zbog poremećaja u prometu kalcija, kod osoba pogođenih ovom bolesti počinju se javljati muskuloskeletna oštećenja koja se manifestuju bolovima, smanjenjem gustine kostiju, lomovima, te osteoporozom (13).



Slika 2: Itai-itai bolest (14)

Dugotrajno izlaganje kadmiju dovodi do njegovog taloženja u plućima. Glavni izvor unosa kadmija kod pušača je duhan, te je zabilježeno da 50-godišnji pušači imaju dvostruko veću količinu kadmija u plućima od vršnjaka nepušača.

Živa

Karakteristike trovanja živom se razlikuju u zavisnosti da li je trovanje izazvano elementarnom živom, njenim anorganskim solima ili metil-živom, te da li je riječ o akutnom ili hroničnom trovanju. Elementarna živa je lahko isparljiva tako da do trovanja obično dolazi njenim udisanjem. Dobro se



apsorbira u plućima, a potom se putem krvotoka prenosi i taloži u centralnom nervnom sistemu ili se zadržava u eritrocitima. Ingestija elementarne žive ne predstavlja veliku opasnost po zdravlje, jer se slabo apsorbuje u crijevima (4). Anorganske soli žive mogu izazivati promjene u moždanoj funkciji koja za posljedicu ima razdražljivost, pojavu tremora, problema s pamćenjem, te promjene u čulima vida i sluha.

Metil-živa se u organizam pretežito unosi putem hrane. Topljiva je u mastima, dobro se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta, a može čak prodrijeti u kožu i preko zaštitnih lateks rukavica. To je vrlo otrovan spoj koji čak i u veoma niskim koncentracijama uzrokuje degenerativne promjene na centralnom nervnom sistemu i smrt. Izloženost trudnica metil-živi utječe na normalan razvoj fetusa i može uzrokovati rađanja djece sa mentalnom retardacijom i teškim malformacijama (15). Kod hronične izloženosti, živa počinje djelovati kao endokrini disruptor ometajući sintezu spolnih hormona narušavajući time mušku i žensku plodnost (4).

Arsen

Iako pripada skupini polumetala, mnogi naučnici svrstavaju arsen u skupinu teških metala zbog toksičnog djelovanja, ali i zbog njegove metalne, stabilne, sive alotropske modifikacije.

Trovanje arsenom pokazuje različite karakteristike u zavisnosti od toga da li je trovanje uzrokovano elementarnim, trovalentnim ili petovalentnim arsenom, odnosno njegovim organskim ili anorganskim jedinjenjem. Anorganski

arsen je mnogo otrovniji od elementarnog arsena, dok je trovalentni arsenit otrovniji od petovalentnog arsena.

Arsen se taloži u mekanim tkivima poput jetre, bubrega, pluća i slezene, ali najdugoročnije skladište za arsen čine tkiva bogata keratinom kao što su koža, kosa i nokti, pa se stoga hronično trovanje obično manifestira pojavom keratoza na koži, promjenama u pigmentaciji i oštećenjem perifernog nervnog sistema. Akutno trovanje arsenom dovodi do oštećenja krvnih sudova i tkiva probavnog trakta, te utječe na rad srca i moždane funkcije što nerijetko može imati smrtni ishod (8).

ISPITIVANJE I PRAĆENJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA

Za kvantitativno određivanje teških metala primjenjuju se metode atomske spektroskopije.

Spektroskopsko proučavanje atoma, odnosno jona elemenata pomoću UV/vis zračenja se može obavljati samo u plinovitoj sredini u kojoj su joni dobro međusobno odvojeni. Stoga je prvi korak u ispitivanju teških metala ovom metodom *atomizacija*, proces u kojem se uzorak isparava uz razgradnju i nastanak atomske pare. Atomizacija je najkritičniji korak u cjelokupnom procesu ispitivanja, jer od učinkovitosti i reproducibilnosti ovog postupka ovise osjetljivost, preciznost i tačnost metode. Na osnovu načina atomizacije uzorka razlikuju se četiri spektroskopske metode: atomizacija u plamenu, elektrotermička atomizacija, atomizacija u indukovanoj kuplovanj



plazmi i atomizacija u plazmi istosmjernoj struji. Atomske metode se temelje na pojavi apsorpcije, emisije i fluorescencije (16). U daljem tekstu će biti obrađena atomska apsorpcijska spektroskopija, odnosno njene tehnike – plamena, grafitna i hidridna tehnika.

Plamena tehnika

Plamena tehnika (Slika 3) je brza i jeftina tehnika čija se osjetljivost nalazi u području koncentracije izražene u *ppm* (eng. parts per million – dijelova po milionu). Shodno tome, ova tehnika se može primjenjivati samo za određivanje esencijalnih teških metala, te za određivanje neesencijalnih teških metala u matriksima gdje se očekuju više koncentracije (kao npr. u tlu). Uzorak se preko kapilare uvodi u nebulizator gdje se raspršuje te se kao aerosol miješa s gorivom i oksidansom koji ga unose u plamen. Najčešće korištene smjese plinova su zrak-acetilen i N_2O -acetilen, ovisno od toga koji element se određuje.



Slika 3: Plamena tehnika atomske apsorpcijske spektroskopije (17)

Grafitna tehnika

Zbog veće osjetljivosti grafitna tehnika (Slika 4) je pogodna za određivanje neesencijalnih teških metala poput Pb i Cd u koncentracijama izraženim u *ppb* (eng. parts per billion). Mali volumen uzorka se uz pomoć kapilare, kroz suženi otvor ubacuje u grafitnu kivetu (cijev). Postupak određivanja se sastoji od nekoliko koraka: sušenje uzorka, karbonizacija, pepelizacija i atomizacija koja se odvija pri temperaturama višim od $2000^{\circ}C$. Atomizirani analit stvara apsorpcijski signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji analita (*Lambert-Beerov zakon*). Kao gorivo se koristi argon.

Za određivanje teških metala u prehrambenim proizvodima plamenom i grafitnom tehnikom, potrebno je prethodno uraditi razaranje uzorka, odnosno mokro spaljivanje. Razaranje uzorka se vrši u teflonskim kivetama u mikrovalnoj peći uz dodatak koncentrovane nitratne kiseline, te koncentrovane hloridne kiseline ukoliko je potrebno izvršiti stabilizaciju određivanog analita. Uzorke vode za piće nije potrebno prethodno razarati ukoliko uzorak nije zamućen niti ima vidljivo onečišćenje.



Slika 4: Grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektroskopije (18)



Hidridna tehnika



Slika 5: Dodatak za hidridnu tehniku koji se postavlja na uređaj za plamenu tehniku (19)

Princip hidridne tehnike se bazira na reakciji oksianiona metaloida sa NaBH_4 , i HCl pri čemu nastaje isparljivi hidrid elementa koji se određuje (H_2Te , H_2Se , H_3As itd.). Nastala smjesa putem cjevčice se prenosi do separatora *plin/tečnost* gdje dolazi do odvajanja smjese hidrida i vodika nastalog kao nusprodukt reakcije. Potom slijedi prečišćavanje pomoću inertnog plina visoke čistoće prije nego se hidrid prenese u staklenu optičku ćeliju gdje se vrši atomizacija. Veoma je bitno da se prije početka ispitivanja metaloid dovede u željeno oksidaciono stanje. Primjera radi, kod određivanja As nakon pepelizacije, u uzorak se dodaje smjesa KI i askorbinske kiseline za redukciju As^{5+} u As^{3+} . Kod hidridne tehnike koriste se argon i smjesa acetilen-zrak.

Maksimalna dozvoljena koncentracija, te način monitoringa teških metala u vodi za piće i prehrambenim namirnicama, definisani su slijedećim pravilnicima:

- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (Službeni glasnik BiH, 68/14)
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće (Službeni glasnik BiH, 40/10, 30/12, 62/17)

Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće definiše MDK koja za As iznosi $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, za Cd $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, Pb $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ i za Hg iznosi $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. U Tabeli 2 i 3 dat je pregled MDK za As, Pb, Cd i Hg u različitim vrstama namirnica.



Tabela 3: Najveća dopuštena količina Pb, Cd i Hg u hrani

Hrana ⁽¹⁾		Najveća dopuštena količina (mg/kg vlažne mase) (NDK)
3.1.	Olovo	
3.1.1.	Svježe mlijeko ⁽⁶⁾ , toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju proizvoda na bazi mlijeka	0,020
3.1.2.	Formule za dojenčad i formule nakon dojenja ⁽⁴⁷⁾⁽⁵⁾	0,020
3.1.3.	Meso (izuzev iznutrica) goveda, ovaca, svinja i peradi ⁽⁶⁾	0,10
3.1.4.	Iznutrice goveda, ovaca, svinja i peradi ⁽⁶⁾	0,50
3.1.5.	Mišićno meso ribe ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾	0,30
3.1.6.	Ljuskavci (Crustaceae) ⁽²⁶⁾ : mišićno meso krakova i abdomena ⁽⁴⁴⁾ . U slučaju rakova i rakovima sličnih tvrdokožaca (kratkorepi morski rakovi – <i>Brachyura</i> i deseteronožci <i>Anomura</i>) mišićno meso iz krakova	0,50
3.1.7.	Žrvi školjkaši ⁽²⁶⁾	1,5
3.1.8.	Glavonožci (bez unutarnjih organa) ⁽²⁶⁾	1,0
3.1.9.	Mahunarke ⁽²⁷⁾ , žitarice i zrna mahunarki	0,20
3.1.10.	Povrće, osim glavičastog povrća, lisnatog povrća, svježeg ljekovitog bilja, gljiva i morskih algi ⁽²⁷⁾ . Za krumpir najveća količina primjenjuje se na oguljene krumpire	0,10
3.1.11.	Glavičasto povrće, lisnato povrće i slijedeće gljive ⁽⁴²⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (obična gljiva), <i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake gljive) ⁽²⁷⁾	0,30
3.1.12.	Voće, izuzev jagodičastog voća i malog voća ⁽²⁷⁾	0,10
3.1.13.	Jagodičasto voće i malo voće ⁽²⁷⁾	0,20
3.1.14.	Masnoće i ulja, uključujući mliječnu masnoću	0,10
3.1.15.	Voćni sokovi, koncentrirani voćni sokovi vraćeni u prvotno stanje i voćni nektari ⁽¹⁴⁾	0,050
3.1.16.	Vino (uključujući pjenušavo vino, izuzev liker vina), jabukovača, kruškovača i voćna vina ⁽¹¹⁾	0,20 ⁽²⁸⁾
3.1.17.	Aromatizirano vino, aromatizirana pića na bazi vina i aromatizirani kokteli od proizvoda vina ⁽¹³⁾	0,20 ⁽²⁸⁾
3.1.18.	Dodatci prehrani ⁽³⁹⁾	3,0
3.2.	Kadmij	
3.2.1.	Meso (izuzev iznutrica) goveda, ovaca, svinja i peradi ⁽⁶⁾	0,050
3.2.2.	Konjsko meso, izuzev iznutrica ⁽⁶⁾	0,20
3.2.3.	Jetra goveda, ovaca, svinja, peradi i konja ⁽⁶⁾	0,50
3.2.4.	Bubreg goveda, ovaca, svinja, peradi i konja ⁽⁶⁾	1,0
3.2.5.	Mišićno meso ribe ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ , izuzev vrsta navedenih u 3.2.6., 3.2.7. i 3.2.8.	0,050
3.2.6.	Mišićno meso sljedećih vrsta ribe ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ : – bonito (<i>Sarda sarda</i>) – obični dvotrakasti arbut (<i>Diplodus vulgaris</i>) – jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>) – sivi cipol (<i>Mugil labrosus labrosus</i>) – konjska skuša ili lokarda (<i>Trachurus species</i>) – skuša (<i>Scomber species</i>) – luvar (<i>Lutjanus imperialis</i>) – sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) – sardinope (<i>Sardinops species</i>) – tuna (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>) – klinasti list (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,10
3.2.7.	Mišićno meso tune u obliku metka (<i>Auxis species</i>) ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾	0,20
3.2.8.	Mišićno meso sljedećih riba ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ : Srdela (<i>Engraulis species</i>) Sabljarka (<i>Xiphias gladius</i>)	0,30
3.2.9.	Ljuskavci (Crustaceae) ⁽²⁶⁾ : mišićno meso krakova i abdomena ⁽⁴⁴⁾ . U slučaju rakova i rakovima sličnih tvrdokožaca (kratkorepi morski rakovi – <i>Brachyura</i> i deseteronožci <i>Anomura</i>) mišićno meso iz krakova	0,50
3.2.10.	Školjkaši mekušci ⁽²⁶⁾	1,0
3.2.11.	Glavonožci (bez unutarnjih organa) ⁽²⁶⁾	1,0
3.2.12.	Žitarice, osim mekinja, klica, pšenice i riže	0,10
3.2.13.	Mekinje, klice, pšenica i riža	0,20
3.2.14.	Soja	0,20
3.2.15.	Povrće i voće, izuzev lisnatog povrća, svježeg ljekovitog bilja, listovi glavičastog povrća, gljiva, stabljičastog povrća, korjenastog povrća, gomoljastog povrća i morskih algi ⁽²⁷⁾	0,050
3.2.16.	Stabljičasto povrće, korjenasto povrće i gomoljasto povrće, osim celera ⁽²⁷⁾ . Za krumpir najveće dopuštene količine odnose se na oguljeni krumpir.	0,10
3.2.17.	Lisnato povrće, svježe ljekovito bilje, listovi glavičastog povrća, celer i sljedeće gljive ⁽⁴²⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (obična gljiva), <i>Pleurotus ostreatus</i> (bukovača), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake gljive)	0,20
3.2.18.	Gljive, osim navedenih u točki 3.2.17. ⁽²⁷⁾	1,0
3.2.19.	Dodatci prehrani ⁽³⁹⁾ , osim navedenih u točki 3.2.20.	1,0
3.2.20.	Dodatci prehrani ⁽³⁹⁾ koji se sastoje samo ili uglavnom od sušene morske trave ili od proizvoda dobivenih od morske trave	3,0



3.3.	Živa	
3.3.1.	Ružičasti proizvodi ⁽²⁶⁾ i mišićno meso ribe ⁽²⁸⁾⁽²⁵⁾ , izuzev vrsta koje su navedene u 3.3.2. Najveća količina za ljuskavce (<i>crustaceans</i>) primjenjuje se na mišićno meso krakova i abdomena ⁽⁴⁴⁾ . Kada se radi o rakovima i rakovima sličnim tvrdokošcima (kratkorepi morski rakovi – <i>Brachyura</i> i desetonožci <i>Anomura</i>), tada se odnosi na mišićno meso krakova	0,50
3.3.2.	Mišićno meso sljedećih vrsta ribe ⁽²⁸⁾⁽²⁵⁾ : <ul style="list-style-type: none"> – morski đavo (<i>Lophius species</i>) – atlantski som (<i>Anarhichas lupus</i>) – bonito (<i>Sarda sarda</i>) – jegulja (<i>Anguilla species</i>) 	1,0
	<ul style="list-style-type: none"> – carska riba, ružičasta vojna riba (<i>Hoplostethus species</i>) – grenadir (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) – plovac (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) – marlin (<i>Makaira species</i>) – megrim (<i>Lepidorhombus species</i>) – cipol (<i>Mullus species</i>) – štika (<i>Esox lucius</i>) – obični bonito (<i>Orcynopsis unicolor</i>) – bakalar (<i>Tricopterus minutus</i>) – portugalska riba pas (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) – raža (<i>Raja species</i>) – crvena riba (<i>Sebastes marinus, S. mentella, S. viviparus</i>) – riba jedro (<i>Istiophorus platypterus</i>) – riba korica (<i>Lepidopus caudatus, Aphanopus carbo</i>) – arbun, pandora (<i>Pagellus species</i>) – morski pas (sve vrste) – zmijska skuša (<i>Lepidocybium flavobrunneum,</i> – <i>Ruvettus pretiosus, Gempylus serpens</i>) – kečiga (<i>Acipenser species</i>) – sabljarka (<i>Xiphias gladius</i>) – tuna (<i>Thunnus species, Euthynnus species, Katsuwonus pelamis</i>) – kingklip riba (<i>Genypterus capensis</i>) – ružičasta jegulja (<i>Genypterus blacodes</i>) 	
3.3.3.	Dodatci prehrani ⁽²⁹⁾	0,10



ZAKLJUČAK

Intenzivni napredak i uspon ljudske civilizacije u posljednjih 250 godina doveo je do toga da se u 21. stoljeću dovodi u pitanje upravo njen opstanak. Razvoj različitih grana industrije i tehnologije, pretjerana urbanizacija, te povećanje broja stanovnika čime se povećala potreba za brzim i efikasnim uzgojem hrane doveo je do nekontrolisanog iskorištavanja prirodnih resursa i zagađivanja našeg prirodnog staništa. Zahvaljujući nama samima, danas se nalazimo u situaciji da se moramo zapitati da li je voda koju pijemo ispravna i da li je hrana koju stavljamo na trpezu uistinu zdrava?

Antropogeno djelovanje dovelo je do naglog porasta prirodnih koncentracija teških metala u atmosferi, hidrosferi i tlu. Ugrozili smo naš jedini izvor hrane pritom ugrozivši naše zdravlje. S obzirom na sveprisutnost teških metala u okolišu, osobito onih koji imaju izrazito štetan utjecaj na cjelokupan živi svijet, neophodno je da se uvedu rigoroznije mjere ispitivanja kontaminanata u vodi za piće i u prehrambenim namirnicama. Poseban akcenat je potrebno staviti na one proizvode koji dolaze sa područja koja gravitiraju velikim industrijskim centrima zbog postojanja veće vjerovatnoće da su upravo ti proizvodi kontaminirani olovom, kadmijem, živom ili arsenom.

LITERATURA

1. Engwa GA, Ferdinand PU, Nwalo FN, Unachukwu MN. Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans, Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog? Ozgur Karcioglu and Banu Arslan, IntechOpen, 2019.
2. Sofilić T. Ekotoksikologija, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet Sisak, 2014.
3. Pašalić A. Primjena fitoremedijacije u procesu dekontaminacije tla od teških metala, magistarski rad. Mašinski fakultet u Zenici, Odsjek za ekološko inženjstvo, 2015.
4. Dedo A. Teški metali sa svojstvima endokrinih disruptora, diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2014.
5. Monisha J et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 2014; 7 (2): 60 – 72.
6. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination 2003; 68 (1): 167 – 182.
7. Mesić H et al. Program trajnog motrenja tala Hrvatske : projekt Izrada programa trajnog motrenja tala Hrvatske s pilot projektom : LIFE05 TCY/CRO/000105. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb 2008; 82.
8. Hu H. Human health and heavy metals exposure. *Life Support: The Environment and Human Health*, Chapter 4. Michael McCally (ed), MIT Press. 2002.



9. Tošić I. et al. Utjecaj poplava na povišeni sadržaj teških metala u inundacijskom području rijeke Drave u varaždinskoj županiji. *Hrvatske vode* 2019; 27 (110): 305 – 316.
10. Goletić Š. Teški metali u okolišu, Univerzitet u Zenici 2005.
11. Goletić Š. Praćenje sadržaja teških metala u tlu i biljkama u okolini Željezare u Zenici. 7. Naučno-stručni skup sa međunarodnim učešćem "KVALITET 2011", Neum, 2011; 743 – 748.
12. Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: A review. *Interdisciplinary Toxicology* 2015; 8 (2): 55 – 64.
13. Nishijo M. Causes of death in patients with Itai-itai disease suffering from severe chronic cadmium poisoning: A nested case-control analysis of a follow-up study in Japan. *BMJ Open* 2017; 7: e015694.
14. Dokmeci AH, Dagdeviren AO. Environmental Toxicity of Cadmium and Health Effect. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 2009; 10(1): 84 – 93.
15. Bernhoft RA. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health*. 2012: 1 – 10.
16. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb 1999; 24: 595 – 619.
17. Internet stranica: <http://www.gbcsoci.com/products/aas/sav-antaa-aas/>
18. Internet stranica: <http://www.gbcsoci.com/products/aas/sav-antaa-z-enduro/>
19. Internet stranica: <http://www.gbcsoci.com/wp-content/uploads/2015/10/04-HG3000-283x300.jpg>



IMPORTANCE OF MONITORING HEAVY METAL CONTENT IN DRINKING WATER AND FOOD PRODUCTS

Salkić A.

ABSTRACT

Discovery of first metal and their use represent a turning point in human history. It is impossible to imagine life in the 21st century without their presence. Cookware, tableware, transport vehicles, medical instruments, electronic devices, and many other items that we use on a daily basis are partly or fully made of metal. Some of them, such as copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn), selenium (Se) and manganese (Mn) are, in smaller concentrations, even essential for the normal functioning of the human body. Among the 35 metal that naturally occur in the earth crust, 23 of them fall into the group of heavy metal. In the literature, the term "heavy metal" is used for metal that possess specific density greater than $\rho = 5 \text{ g / cm}^3$. However, in colloquial language, this term is mainly used for metal such as cadmium (Cd), lead (Pb) and mercury (Hg) that have been proven to be toxic to living organisms. Arsenic (As), although it is a semi-metal, due to its extreme toxicity also falls into this group. Toxicity of heavy metals is emphasized due to the fact that when they enter the (human) organism they accumulate in the liver, lungs, kidneys, brain and other organs, and affect physiological processes in respective tissues.

Corresponding author:

*Amra Salkić, MA Chemical Engineering
Institute for Health and Food Safety Zenica,
B&H
Department of chemical diagnostics
E-mail: amra.salkic@inz.ba
Tel: +387 61 325 476*



Uputstvo za autore

Strukturu rada čini:

1. naslovna strana,
2. sažetak
3. glavni dio (razrada teme),
4. zaključak,
5. spisak literature i
6. prilozi (po potrebi).

1. Naslovna strana je prva strana rada. Ona treba da pruži osnovne informacije o autoru i radu, hronološkim redom (koristiti Times New Roman, font 12):

- Naziv/naslov rada
- Autor/i (ime i prezime)
- naziv Institucije/a,
- naziv Odjeljenja ili Službe (ukoliko je osoba zaposlena),
- podatke o osobi za korespondenciju (ime i prezime, institucija, adresa, broj telefona, E-mail).

2. Sažetak na originalan način prezentira suštinu problema koji se razmatra u radu, ukazuje na njegov značaj, razloge (motive) za njegovu obradu i daje kratak pregled sadržaja rada. Obim sažetka je poželjno da bude u 300 riječi. Sažetak pisati na jezicima naroda BiH, te na engleskom jeziku.

3. Glavni dio (razrada teme) je osmišljen, temeljan i argumentovan prikaz teorijske utemeljenosti teme (analiza literature i prethodnih srodnih istraživanja) i praktičnih (ilustrativni primjeri, po pravilu originalni) rezultata koji se odnose na zadatak temu, metodološkog pristupa istraživanju i

rezultata istraživanja i njihove interpretacije. On je najvažniji i svakako najobimniji dio rada (obično čini 70–80% rada). Njime treba obuhvatiti sve ono što je u sažetku napisano. Ukoliko je autor koristio praktični dio i posjeduje rezultate, onda na početku glavnog dijela navodi sekciju „Materijal i metode“, te na kraju glavnog dijela sekciju „Rezultati“.

4. Zaključak je finalni dio rada. U njemu se na sistematičan i koncizan način saopštavaju najvažnija saznanja do kojih se došlo. On proizilazi iz čitavog sadržaja rada, pa se preporučuje autoru da detaljno pročita sve ono što je prethodno napisao. U zaključku treba da se ocijeni, po mogućnosti kritički, tema koja je bila predmet razrade, procjene stanja ili situacije, potvrde ili odbace postavljene hipoteze, iskažu poruke i doprinos rada, kao i da se ukaže na probleme i pitanja koja bi trebalo dalje obraditi i proučiti.

5. Spisak literature je sistematski pregled svih izvora koji direktno ili indirektno tretiraju sadržaj teme rada i koji su korišteni tokom izrade. Postoje različiti sistemi navođenja referenci u literaturi.

Molimo pisati radove po vankuverskom sistemu. Vankuverski sistem navođenja izvora poznat je i kao numerički sistem, jer se oslanja na upotrebu brojkama pri navođenju referenci u spisku literature i to npr (1) ili ako imate slijed više referenci (1-5). Navedene brojke koriste se i za objašnjavanje autorstva u



otvorenom tekstu. Ovaj sistem je dobio ime prema Međunarodnom udruženju urednika medicinskih časopisa (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) koje je ustanovilo obrazac za naučne radove koji se podnose medicinskim časopisima. Udruženje je poznato i kao Vankuverska grupa koja je prvi sastanak održala u Vankuveru 1978. godine. Popis referenci (izvora) u spisku literature reda se redoslijedom kojim se pojavljuju u tekstu.

Primjeri

Knjiga jednog autora: 1. Uzunović-Kamberović S. Medicinska mikrobiologija, Zenica: Fojnica, 2009.

Knjiga dva autora: 2. Durmišević S, Ibrahimagić A. Higijena i zdravstvena ekologija – praktikum dopunjeno izdanje. Univerzitet u Zenici, 2018.

Članak iz časopisa:

1. Prinarhis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gozouli M, Tzouvelekis LS. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
2. Bedenić B, Žagar Ž. Increased Beta-Lactamase Activity in *Branhamella Catarrhalis* after Exposure to Amoxicilin and Clavulanic Acid. *J Chemother* 1994; 6(6):383-7.

3. Članak preuzet sa internet sajta: Navesti autora i naslov te [Internet].Dostupno na: http://ppf.unsa.ba/Dokumenti/uputstvo_za_izradu_ms_rada.pdf [pristupljeno 30. 03. 2016].

6. Prilozi

Slike, tabele, grafikoni i sl. mogu se dati u sklopu teksta, a ako su obimniji na posebnoj stranici u prilogu. U podnožju slike piše se redni broj slike i njen naziv. Ako je slika preuzeta od drugog autora, onda se ispod naziva slike navodi izvor iz koga je slika preuzeta.

Tabele sadrže neophodne podatke prikazane na pregledan način. Iznad tabele se stavlja redni broj tabele i naziv u što kraćem obliku, a ako je tabela preuzeta iz nekog izvora onda se u podnožju tabele navode bibliografski podaci tog izvora i stranica sa koje je tabela preuzeta.