



## 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  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra (ESBL), plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze i karbapenemaze, karbapenemaza pozitivni *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*, penicilin-rezistentni *Streptococcus pneumoniae* te vankomicin-rezistentni enterokok.  $\beta$ -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- $\beta$ -laktamske antibiotike. Plazmidne AmpC  $\beta$ -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena na plazmid enterobakterija. Te  $\beta$ -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije  $\beta$ -laktama i inhibitora  $\beta$ -laktamaza.

Enterobakterije mogu razviti rezistenciju na karbapeneme uslijed hiperprodukcije  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra ili plazmidnih AmpC  $\beta$ -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane ili zbog produkcije karbapenemaza iz grupe A (KPC, IMI, NMC, SME), B (metalo- $\beta$ -laktamaza iz VIM, IMP i NDM serije) ili D (OXA-48  $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -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.  $\beta$ -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- $\beta$ -laktamske antibiotike (1). Mutacije mijenjaju strukturu aktivnog središta tako



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

Prva  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra bila je SHV-2  $\beta$ -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). Dijele se u tri velike porodice: TEM, SHV i CTX-M. TEM i SHV  $\beta$ -laktamaze proširenog spektra se najčešće javljaju u hospitalnim izolatima dok su CTX-M  $\beta$ -laktamaze češće u izvanbolničkoj populaciji. TEM i SHV  $\beta$ -laktamaze nastaju od parentalnih TEM-1, TEM-21 i SHV-1  $\beta$ -laktamaza mutacijama koje mijenjaju konfiguraciju aktivnog središta i šire spektar djelovanja enzima (2). Za razliku od njih CTX-M  $\beta$ -laktamaze su nativne ESBL, a nastale su od kromosomskih  $\beta$ -laktamaza vrste *Kluyvera ascorbata* i *Kluyvera georgiana* (3). Prva CTX-M  $\beta$ -laktamaza bila je CTX-M-1 opisana u Njemačkoj 1995. godine („cefotaximase-Munich“). Dijele se u pet grupa: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 i CTX-M-25 (4). CTX-M  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra kao što su PER, VEB i IBC  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaze su nastale prijenosom kromosomskog ampC gena na plazmid enterobakterija. Te  $\beta$ -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije penicilina i inhibitora  $\beta$ -laktamaza (13, 14).

Plazmidne AmpC  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaze uzrokuju rezistenciju na peniciline, cefalosporine prve, druge i treće generacije te kombinacije penicilina i inhibitora  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra ili plazmidnih AmpC  $\beta$ -laktamaza u kombinaciji s gubitkom porina vanjske membrane ili zbog produkcije karbapenemaza iz grupe A (KPC, IMI, NMC SME), B (metalo- $\beta$ -laktamaza iz VIM, IMP i NDM serije) ili D (OXA-48  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamaza pronađena je u *C. freundii* (Tajvan) (26) i *E. cloacae* (Južna Koreja) (30). Ta alelska varijanta je proširena diljem svijeta. VIM-4  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamazu (33). Soj je bio rezistentan na većinu antibiotika uključujući i kolistin, a osjetljiv samo na tigecklin. 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  $\beta$ -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). Zasad su NDM enzimi pronađeni samo u Enterobakterija, *P. aeruginosa* i *A. baumannii*. U početku su NDM  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -laktamazu (16) i *K. pneumoniae* pozitivni na KPC  $\beta$ -laktamaze (19), a u Kanadi je opisana NDM-1  $\beta$ -laktamaza (36). U Francuskoj također dominiraju karbapenemaze iz grupe A kao što je IMI-1  $\beta$ -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- $\beta$ -laktamaze iz VIM serije u izolatima *E. cloacae* i *K. pneumoniae* (28, 29, 33, 44), ali je opisana i KPC-2



$\beta$ -laktamaza u izolatu *K. pneumoniae* (45) i *Salmonella* spp (21). OXA-48  $\beta$ -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  $\beta$ -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 reservoir 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 reservoiri 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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect* 2008; 14(Suppl. 1):33-41.
5. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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, Rousseau M, Fournier G, Marie O, Schlimmer B, Philipon A. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4  $\beta$ -lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:797-803.
12. Essack SY: Treatment options for extended-spectrum  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase of *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:939-946.
18. Pröttumarthy 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  $\beta$ -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, Whitchard 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- $\beta$ -lactamases: The quiet before the storm. *Clin Microbiol Rev* 2005;18 (2):306-325.
23. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi 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  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:503-511.
27. Lauretti L, M.L. Riccio, A. Mazzariol, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-  $\beta$ -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- $\beta$ -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*<sub>VIM-1</sub> 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- $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>N<sub>DM</sub>-1</sub>, 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- $\beta$ -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, Vandael W, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for carbapenem hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1 from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262-1270.
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  $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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, Bedenic B, Baraniak A, Fielt J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, Gniadkowski M. *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in *Escherichia coli* from Croatian hospitals are located in new (*bla*<sub>CTX-M-3</sub>) and widely spread (*bla*<sub>CTX-M-3a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) 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 -Grlic 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, Godić-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  $\beta$ -lactamase and/or plasmid-mediated ampC  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamases-producing hydrolyze oxyiminocephalosporins and aztreonam, are mostly produced by Enterobacteriaceae, and are encoded on transferable plasmids which often contain resistance genes to non- $\beta$ -lactam antibiotics. Plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases descend from the chromosomal ampC gene transferred to the plasmid. Those  $\beta$ -lactamases confer resistance to first, second and third generation of cephalosporins, monobactams, and to  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. Enterobacteriaceae may develop resistance to carbapenems due to the hyperproduction of ESBLs or plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in combination with porin loss or due to the production of carbapenemases of class A (KPC, IMI, NMC, SME), B (metallo- $\beta$ -lactamases from VIM, IMP or NDM series), and D (OXA-48  $\beta$ -lactamase). Carbapenemases found in *Acinetobacter* spp. belong to molecular class A (KPC), B (metallo- $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -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***